

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline: Biologie des Populations et Ecologie

Ecole Doctorale :
Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement

présentée et soutenue publiquement
par

Florent Kempf
le 12 décembre 2008

**Structure génétique et évolution de la spécialisation
chez deux ectoparasites hématophages, les tiques *Ixodes uriae*
et *I. ricinus*, vecteurs de la borréliose de Lyme**

JURY

Mmes.	LORENZA BÉATI, Curator, Associated Professor, Georgia Southern University (E.-U.)	Examinatrice
	KAREN D. MCCOY, Chargée de Recherche, CNRS, Montpellier	Directrice de thèse
MM	THIERRY DE MEEUS, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Co-directeur de thèse
	BRUNO FAIVRE, Professeur, Université Bourgogne, Dijon	Rapporteur
	BERNARD GODELLE, Professeur, Université Montpellier II	Examineur
	JEROME GOUDET, Professeur, Université de Lausanne (Suisse)	Rapporteur
	OLIVIER PLANTARD, Chargé de Recherche, INRA, Nantes	Examineur

Laboratoire d'accueil

Equipe «Structures Génétiques et Adaptations dans les Systèmes Symbiotiques»

Unité «Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses»

UMR 2724 (CNRS-IRD)

IRD, 911 avenue Agropolis,
34394 Montpellier Cedex 5, France

Remerciements

A l'heure de conclure ces trois années, je souhaiterais remercier vivement de nombreuses personnes que j'ai eu la chance de croiser :

- François Renaud et Michel Tibayrenc pour m'avoir accueilli dans le laboratoire du GEMI, où j'ai pu trouver d'excellentes conditions de travail et un environnement stimulant. Je remercie, de manière plus générale, le centre IRD de Montpellier, où ces travaux ont été réalisés.

- Christian Auclair et le département « Biochimie – Génie Biologique » de l'ENS Cachan, pour avoir accordé l'allocation de thèse qui a rendu possible ces travaux. Je remercie également le Bureau des Ressources Génétiques (projet n°54), l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-JCJC-0095-01) et l'Institut Polaire Français – Paul Emile Victor (Programme n°333) pour avoir financé nos échantillonnages et travaux d'analyse.

- Mes deux directeurs de thèse : Karen D. McCoy d'abord, pour m'avoir fait confiance après un DEA délicat, et m'avoir inlassablement formé à notre belle discipline. J'espère sans trop y croire t'avoir rendu un peu de tout cela ; quoi qu'il en soit, je tiens toujours quelques pots de miel à ta disposition, et je souhaite à tous les étudiants de France ou du Canada une directrice de ton calibre. Thierry de Meeûs ensuite, dont la contribution à ce travail a été bien au-delà d'une co-direction formelle ; pour ta rigueur et ton intuition, et pour avoir échoué malgré mille tentatives à débusquer des lacunes dans tes connaissances infaillibles, en génétique notamment, exceptées peut-être quelques menues imprécisions sur les toponymes germaniques.

- Les membres de mon jury de thèse, le président Bernard Godelle, les rapporteurs Bruno Faivre et Jérôme Goudet, et les examinateurs Lorenza Béati et Olivier Plantard pour leurs commentaires précieux et l'intérêt manifesté pour ce travail. Je remercie par ailleurs Olivier pour avoir été, en plus de cela, un des collaborateurs importants de ce travail.

- Les membres de mes deux comités de thèse, Thierry Boulinier, Nicolas Galtier et Johan Michaux pour leurs encouragements, et pour avoir très pertinemment poussé cette thèse dans des voies qui se sont avérées fructueuses. J'adresse une pensée toute particulière à Thierry Boulinier pour sa contribution indispensable au travail de terrain dans les frimas islandais ou norvégiens.

- Les deux autres membres éminents de l'équipe du SGASS, Christine Chevillon et Franck Prugnolle, pour leur disponibilité et leur contribution tant scientifique qu'humaine à ce travail.

- Theresa Burg, pour avoir pris le temps de relire les dernières nouvelles d'*Ixodes uriae*, pour ses commentaires et encouragements.

- Les membres de la petite communauté de « tiquologues » croisés dans les réunions du groupe Tiques et Maladies à Tiques du Réseau Ecologie des Interactions Durables. Je pense notamment aux interactions avec Brigitte Degeilh et Laurence Vial.

- Les collaborateurs qui ont rendu possible – et le Dieu de la biologie sait combien cela fut incertain jusqu’aux derniers mois – l’échantillonnage d’*Ixodes ricinus* : je pense à Jean Joachim et aux Toulousains de l’INRA, pour leur accueil tout en simplicité et sympathie, et aussi à Cyril Eyraud, Dieter Heylen et Veronika Taragel’ová.

- La petite équipe du plateau technique de l’UMII, Erick et Frédérique, pour m’avoir ouvert les portes de leur séquenceur automatique, qui a pallié au vénérable mais déclinant appareil du GEMI.

- J’en viens donc naturellement à tous les autres membres du laboratoire. Parmi les dizaines de permanents et étudiants de passage - dont j’aurai bien du mal à choisir quelques uns à ne *pas* remercier - je pense ici particulièrement à Audrey et Nadine, les virtuoses d’XLab ; Céline et Patrick/Paco, les incontournables de la paillasse ; Ana, Basile, Benjamin, Camille, Harling, Thierry L., Virginie, camarades thésards et aussi David, Elena, Hervé, Muriel qui ont plus particulièrement travaillé avec Karen, auxquels je souhaite le meilleur possible pour la suite ; dans le désordre, Yannis (qui connaît bien mal les champions de France 1979), Valérie, Christine S., Phil, Sylvain Ga., Anna, Anne-Laure, Mallo’, Sylvain Go., Marc, Jean-François, Frédéric, Dorothée, François C., Christian, Sylvie et tous ceux que j’oublie involontairement.

- L’équipe du bâtiment 4 de l’UMII, les souris sacrifiées sur l’autel de la Science sans oraison funèbre, les fleurs, les étudiants de 19h45, les frères et sœurs d’armes du monitorat, les responsables des modules d’enseignement que j’ai eu la chance d’enseigner.

- Monsieur/Marc Kauffman, pour son intérêt et ses corrections, auxquelles je n’ai pas pu accorder l’intérêt qu’elles méritaient faute de temps.

- Enfin, je remercie profondément tous mes amis et la famille Kempf, à laquelle je dédie cette thèse, et qui cachait assez mal sous une admiration gênante son soutien indéfectible.

Résumé / Abstract

De nombreuses études ont été consacrées à expliquer la diversité du vivant. Chez les parasites, la spécialisation pour différents types d'hôtes peut être un processus clé dans l'émergence et le maintien de cette diversité. Les traits d'histoire de vie du parasite et de ses hôtes conditionnent la structuration de la variation génétique dans le temps et l'espace, et de là, la possibilité des divergences liées à l'hôte. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la spécialisation dans deux systèmes hôtes/parasites impliquant des vecteurs de la borréliose de Lyme: les tiques *Ixodes uriae*, qui exploite les oiseaux marins coloniaux des régions polaires, et *Ixodes ricinus*, que l'on rencontre sur un large spectre d'hôtes terrestres en Europe. Ces deux congénériques ont en commun de nombreux traits, mais diffèrent notablement dans les types d'hôtes qu'ils exploitent et leur stratégie de rencontre. D'après les éléments de la biologie de base de ces espèces, nous avons formulé plusieurs hypothèses sur la répartition de l'information génétique de ces parasites en populations naturelles, et plus particulièrement entre leurs hôtes à l'échelle locale. De larges échantillonnages ont été réalisés, et les tiques ont été caractérisées à l'aide marqueurs microsatellites et mitochondriaux. Ces données ont été analysées à l'aide de différents outils statistiques fréquemment utilisés en phylogéographie et en génétique des populations, incluant des méthodes récemment développées. Dans leur ensemble, les résultats ont permis d'établir un scénario d'évolution récente et récurrente de la spécialisation chez *I. uriae*, qui varie en fonction des traits des hôtes et leurs interaction locale avec la tique. Nos résultats suggèrent également l'existence chez *I. ricinus* de races spécialisées sur différents types d'hôtes (oiseaux, petit mammifères, etc.), et de mécanisme d'appariement assorti des partenaires sexuels au sein de ces races. Cette étude souligne l'importance des traits des parasites dans leur diversification (dispersion, stratégie de rencontre des hôtes et d'appariement). En particulier, la formation des races d'hôtes dans les populations de tiques va fortement affecter la circulation des pathogènes qu'ils transportent, et remet ainsi en cause nos connaissances actuelles sur l'épidémiologie des maladies à tiques comme la borréliose de Lyme.

Mots-clefs Génétique des populations, interactions hôtes-parasites, spécialisation, tiques, *Ixodes uriae*, *Ixodes ricinus*, marqueurs microsatellites, dispersion sexe-spécifique, borréliose de Lyme

Many studies have been devoted to understanding the origin of life's vast diversity. In parasitic organisms, host specialization may be a key process in the emergence and maintenance of this diversity. Host and parasite life history traits can shape the spatial and temporal patterns of genetic variation, and thus, the possibility of host-associated divergence. In this thesis, we examine the evolution of host specialization in two host/parasite systems involving tick vectors of Lyme borreliosis: *Ixodes uriae*, a tick that exploits colonial seabirds in polar regions and, *Ixodes ricinus*, a tick with a large spectrum of terrestrial hosts in Europe. These congeneric species share many traits, but differ noticeably by the characteristics of the hosts they exploit and the strategies they use to encounter these hosts. Based on the basic biology of these ticks, we have formulated several hypotheses concerning the distribution of their genetic variation in natural populations and particularly among their local hosts. Ticks were sampled across a large spatial scale and were characterized using microsatellite and mitochondrial markers. We analyzed this data using different statistical tools frequently employed in phylogeography and population genetics, including some recently developed methods. Taken as a whole, our results support a scenario of recent and recurrent evolution of host races in *I. uriae*, where the local outcome of the interaction varies in space and among host species. Our results also suggest the existence of races specialized on different host types within *I. ricinus* populations (birds, rodents, lizards, etc), and a potential mechanism for assortative mating in these races. Overall, the work presented in this thesis highlights the importance of parasitic traits for the diversification process (dispersal, host encounter strategies, mate pair formation). More specifically, the frequent evolution of specific host races within tick populations will have important consequences for the circulation of the pathogens they carry and, as such, calls into question our current understanding of the epidemiology of tick-borne diseases such as Lyme borreliosis.

Keywords Population genetics, host-parasite interactions, specialization, ticks, *Ixodes uriae*, *Ixodes ricinus*, microsatellite markers, sex-specific dispersal, Lyme borreliosis

Liste des tableaux et figures

Figure 1. Relations phylogénétiques au sein des Ixodidae (p. 8)

Figure 2. Distributions connues d'*Ixodes ricinus* et d'*I. uriae* (p. 9)

Figure 3. Le cycle de vie d'*Ixodes uriae* (p. 10)

Figure 4. Le cycle de vie d'*Ixodes ricinus* (p. 10)

Figure 5. Schéma des patrons phylogéographiques attendus dans le cas d'une évolution ancienne ou récurrente des races d'hôtes (p. 19)

Figure 6. Représentation de l'isolement par la distance entre sites Suisses (p. 109)

Tableau I. Principaux agents pathogènes transmis ou détectés chez *I. ricinus* et *I. uriae* (p. 16)

Table des matières

1. Introduction.....	p.1
1.1. La spécialisation des parasites	p.2
1.2. La spécialisation chez <i>Ixodes ricinus</i> et <i>I. uriae</i>	p.4
2. Système biologique	p.6
2.1. Systématique et phylogénie	p.7
2.2. Aires de répartition	p.8
2.3. Cycles de vie	p.9
2.3.1. Généralités	p.9
2.3.2. Quel individu hôte? La stratégie de rencontre	p.11
2.3.3. La vie sans ou avec l'hôte: périodes d'activité, périodes de repos	p.11
2.3.4. Quelle espèce hôte ?	p.11
2.4. Ecologie d' <i>Ixodes ricinus</i> et d' <i>I. uriae</i>	p.13
2.4.1. Interactions avec le milieu	p.13
2.4.2. Interactions avec l'hôte.....	p.13
2.4.3. Interactions avec les conspécifiques.....	p.14
2.4.4. Dispersion.....	p.14
2.5. Rôle de vecteur d' <i>Ixodes ricinus</i> et <i>I. uriae</i>	p.15
2.5.1. Des vecteurs de nombreux pathogènes.....	p.15
2.5.2. <i>I. ricinus</i> et <i>I. uriae</i> dans l'épidémiologie de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	p.15
2.5.3. Interactions hôte/tique/ <i>B. burgdorferi</i> s.l.	p.17
3. Questions abordées	p.18
4. <i>Ixodes uriae</i> : l'évolution récente des races d'hôtes	p.22
4.1. <i>Recent evolution of host specialization in the seabird tick Ixodes uriae, a vector of Lyme Borreliosis</i> (en préparation)	p.23
5. <i>Ixodes ricinus</i> : appariement assorti, dispersion, sous-structure et spécialisation par type d'hôtes	p.51
5.1. <i>Assortative Pairing in Ixodes ricinus L. (Acari:Ixodidae), the European Vector of Lyme Borreliosis</i> (J. Med. Entomol., sous presse)	p.52
5.2. <i>Population structure, Wahlund effects and sex biased dispersal in Ixodes ricinus, the European vector of Lyme borreliosis: new tools for old data</i> (soumis)	p.58
5.3. <i>Is the European vector of Lyme borreliosis, Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae), a true generalist tick?</i> (en préparation)	p.84

5.4. Bilan: la complexité du modèle <i>Ixodes ricinus</i>	p.105
6. Discussion générale:	p.106
7. Perspectives de recherche	p.111
8. Références bibliographiques	p.114



1. Introduction

1.1. La spécialisation des parasites

L'énigme de la diversité

La biologie se propose dans un premier temps de décrire la diversité du monde vivant: cette diversité peut être considérée à différentes échelles qui la structurent de façon pertinente (Blondel, 1995). Mais une fois entrevue l'incroyable profusion du vivant, la fascinante rive enchevêtrée de Darwin (1859), surgit la question de la causalité. Aristote, déjà, en distinguait différents niveaux (Aristote, -335/-323). Si l'on tente de les transposer dans les termes de la biologie moderne, cela revient à d'abord en chercher les causes proximales, puis la réponse aux questions suivantes; comment est générée, comment se maintient et comment évolue cette diversité? Le cas des parasites, auxquels sont consacrés le présent travail, est tout particulièrement remarquable, ceux-ci représentant une large part de la diversité du vivant (De Meeûs *et al*, 2002; Price, 1980).

Contexte écologique, micro- et macroévolution

La diversification n'est rendue possible que par un certain contexte écologique (e.g., isolement géographique, préférences dans le choix du partenaire sexuel; Kirkpatrick et Ravigné, 2002). Ainsi, le parasitisme peut être défini comme l'interaction intime et durable d'un organisme avec son individu hôte – ou ses individus hôtes dans le cas d'un parasite à plusieurs hôtes obligatoires (Combes, 1995; Price, 1980). Être un parasite suppose donc de s'adapter au milieu extérieur, aux compétiteurs, prédateurs, et autres parasites, mais surtout à l'hôte lui-même. L'hôte, qui représente une large part des contraintes environnementales du parasite, est lui-même variable dans le temps et dans l'espace. Le parasite est structuré dans l'espace entre les micro-habitats au sein des individus hôtes, entre individus, populations, espèces (Clayton *et al*, 2003; De Meeûs *et al*, 1998). C'est pourquoi, la distribution spatiale du parasite doit être considérée à différentes échelles: ainsi, la notion d'allopatric (i.e., caractère de deux populations occupant des espaces distincts) peut concerner à la fois l'aire géographique mais aussi l'isolement entre hôtes infectés, eux-mêmes sympatriques (i.e. présents dans le même espace géographique) (McCoy, 2003; Poulin, 2007). Par ailleurs, l'hôte est également variable dans le temps, de par les réponses comportementales, physiologiques et démographiques qu'il développe (De Meeûs *et al*, 1998; Krasnov *et al*, 2003). Rapportée aux caractéristiques des parasites, ce sont des variations de grande échelle: les parasites sont en effet souvent de taille relativement petite, ont une faible mobilité, et exploitent de larges unités de ressources (Price, 1980). D'un point de vue écologique, la diversité des parasites peut ainsi s'expliquer en partie comme résultant de l'équilibre dynamique entre extinction, colonisation et divergence des différents compartiments de son habitat (Poulin, 2007).

Dans ce contexte, la diversification est d'abord un processus microévolutif (i.e., se produisant à des échelles de temps de quelques générations (Gingerich, 2001; Hairston *et al*, 2005), qui passe par l'action de différentes forces modelant la variation génétique; sélection, migration et dérive. Ces forces agissent en redistribuant la variation créée par les mutations. Ainsi, de nombreux modèles théoriques de cette divergence ont été proposés; de façon générale, ces modèles supposent l'existence d'un polymorphisme dans l'adaptation aux différents habitats, soumis à une forte sélection disruptive associée à des mécanismes d'isolement reproducteur (e.g., Kirkpatrick et Ravigné, 2002; Via, 2001). Dans le cas du parasitisme, ceci peut se décliner en polymorphisme de spécialisation sur différents hôtes, et une reproduction dans ou sur l'hôte (Combes et Théron, 2000): la spécialisation pour les différents hôtes est donc un facteur important dans la dynamique de spéciation chez les parasites (De Meeûs *et al*, 1998). La littérature en offre ainsi de nombreux exemples bien documentés (e.g., Filchak *et al*, 2000; Hafner et Page, 1995 ; Stireman *et al*, 2006).

Ces aspects d'ordre qualitatif (i.e., répondant aux questions «comment survient et se maintient la diversité des parasites») amènent à la dimension quantitative du problème. A quelle vitesse cette évolution se produit-elle? A quelle échelle spatiale se produit-elle? Ou pour mieux dire: les modèles proposés suffisent-ils réellement à expliquer la profusion des parasites? Il a été montré que, dans certains, de forts patrons de sélection pouvaient causer de telles différenciations à de très courtes échelles de temps (Filchak *et al*. 2000; Schwarz *et al*. 2005). A l'échelle macroévolutive (i.e. à l'échelle de temps géologique, Gingerich, 2001), certains groupes de parasites peuvent ainsi être le résultat de très anciennes associations avec des hôtes dont ils partagent en partie l'histoire (Hafner et Page, 1995; Nieberding *et al*. 2004). Pour les deux partenaires, il peut s'agir de poursuivre sans cesse la « course aux armements » imposée par leur évolution réciproque (Thompson, 1994), et dans laquelle la rapidité d'évolution est cruciale.

Les parasites et leurs hôtes: spécialistes et généralistes

Les relations complexes des parasites avec leur environnement en font bien souvent des spécialistes par excellence (Combes, 1995; Price, 1980). Cependant, la notion de spécificité est plus ou moins stricte: elle peut désigner l'association spécifique à différents niveaux, par exemple entre espèces ou génotypes d'hôtes et de parasites. De plus, le degré de spécialisation peut également varier le long de l'aire de distribution d'un parasite.

Quels sont les facteurs susceptibles de maintenir la spécialisation, et de déterminer son intensité et sa direction? De façon générale, on considère qu'une forte prédictibilité de la rencontre de l'hôte (abondance, stabilité temporelle) favorise le spécialiste, qui évite le coût de l'investissement dans des adaptations multiples du par exemple aux systèmes immunitaires qu'il

affronte (Combes, 1995). Néanmoins, le niveau auquel se produit la sélection peut nuancer ces prédictions. (en fonction ou indépendamment de la densité dans les différents hôtes: respectivement *soft* et *hard selection*) (De Meeûs et Goudet, 2000) Mais, dans le cas où les ressources hôtes sont de taille inégale, la spécialisation est attendu quelle que soit le schéma de sélection. A contrario, le généraliste est plus à même de se maintenir dans des populations d'hôtes instables (Combes, 1995). De plus, dans les cas de ressources hôtes de taille comparable, les conditions de maintien des spécialistes sont plus restreintes (De Meeûs et Goudet, 2000)

1.2. La spécialisation chez *Ixodes ricinus* et *I. uriae*

Les tiques sont des vecteurs de pathogènes humains et animaux de grande importance (Parola et Raoult, 2001; Troughton et Levin, 2007). De ce fait, de nombreux aspects de leur biologie de base (exigences écologiques, interactions avec les conspécifiques, les hôtes,...) sont connus. Les tiques sont souvent abondantes et relativement aisées à échantillonner (i.e. notamment en utilisant la technique de balayage de la végétation avec une pièce de tissu). Du point de vue appliqué, l'étude des tiques ouvre la voie à une meilleure compréhension de la dynamique de transmission des pathogènes qu'elles transmettent, leur émergence, leur maintien et leur évolution, et, par conséquent, du fonctionnement des systèmes tiques/pathogènes. D'un point de vue plus fondamental, les tiques sont d'intéressants modèles pour l'étude de la spécialisation. En effet, de par leur large spectre d'hôtes, leur étendue géographique ces espèces sont impliquées dans une large gamme d'interactions écologiques.

Le présent travail a consisté à étudier différents aspects de la spécialisation chez deux espèces de tiques dures du genre *Ixodes* sp., et à mener la comparaison de ces systèmes. *Ixodes uriae* est une tique parasite des oiseaux marins coloniaux des deux hémisphères. *Ixodes ricinus* est une espèce parasite de nombreux vertébrés d'Europe et d'Afrique du Nord. Ces deux espèces réunissent plusieurs conditions propices à l'émergence de la spécialisation (Magalhaes *et al*, 2007) :

- Les deux espèces ont des capacités de dispersion autonome réduites. Les événements de migration à longue distance sont liés à l'hôte; ceci augmente la probabilité de rencontre d'un même type d'hôte dans un nouvel environnement, notamment pour *I. uriae*.

- Mis à part les événements de migration à longue distance, *I. uriae* est extrêmement philopatrique, car son cycle de vie s'accomplit préférentiellement à l'endroit de la naissance (le nid de son hôte). Ceci favorise l'appariement des apparentés, et donc l'isolement reproducteur entre pools de tiques sur différentes espèces hôtes qui ne partagent pas forcément les mêmes zones

de nidification même quand elles sont en sympatrie dans une colonie. Ce caractère n'est pas partagé par *I. ricinus* dont les adultes peuvent cependant s'accoupler sur l'hôte final.

- Les mécanismes de l'interaction physiologique entre tiques et hôtes sont complexes, ce qui favorise l'émergence d'un polymorphisme dans l'exploitation des hôtes, précurseur de la spécialisation.

Chez *I. uriae*, des études préalables ont ainsi mis en évidence l'existence d'une différenciation entre des individus échantillonnés sur différents hôtes (McCoy *et al*, 2001; 2005). Au delà de leur apparentement et de caractéristiques biologiques proches, ces deux espèces de tiques présentent des différences pouvant conduire à de fortes différences dans leur degré respectif de spécialisation. En effet, pour *Ixodes uriae*, les populations sont isolées par la barrière géographique constituée par la mer; de plus, les populations d'hôtes sont prévisibles et stables, même si la dynamique d'occupation des sites par les oiseaux peut conduire à des disparitions locales (Boulinier et Danchin, 1996). En revanche, pour les populations d'*I. ricinus* les facteurs d'isolement géographique ne sont *a priori* pas aussi forts, et la structure des communautés d'hôtes est différente de celles des colonies d'oiseaux coloniaux, en termes de richesse spécifique, de densité et de divergence entre hôtes potentiels. Dans cette seconde espèce, la spécialisation éventuelle résulterait d'un compromis différent entre probabilité de rencontre des hôtes, et coût de l'adaptation à des hôtes beaucoup plus distants phylogénétiquement (e.g. oiseaux, mammifères).

2. Système biologique

2.1. Systématique et phylogénie

Les tiques appartiennent à l'ordre des Acariens parasitiformes, qui regroupe environ 80 des 200 familles d'Acariens (Klompen *et al*, 2007). Au sein de cet ordre, elles ne représentent que trois familles: les Argasidae ou 'tiques molles', les Ixodidae ou 'tiques dures', que l'on reconnaît aux éléments rigides de leur exosquelette (voir Estrada-Peña *et al*, 2004), et les Nuttalliedidae contenant une unique espèce *Nuttalliella namaque* (Camicas, 1998). Selon une étude récente (Klompen *et al*, 2007), ces divisions systématiques basées sur la morphologie sont confirmées par l'analyse phylogénie moléculaire.

Ixodes ricinus et *Ixodes uriae* sont toutes deux des tiques dures, de la même famille (Ixodidae), même sous-famille (Prostriata) et même genre qui comprend environ 250 espèces. Cependant, elles appartiennent à deux complexes d'espèces différents: d'une part, pour certains auteurs (Klompen *et al.*, 2000; Barker, Murrell, 2002; Murrell *et al.*, 2003), *I. uriae* est l'une des trois espèces du complexe *Ixodes tasmani*, avec *I. tasmani* et *I. holocyclus* (Klompen, 2000); d'autre part, *I. ricinus* est l'une des 14 espèces du complexe *I. ricinus* (Xu *et al*, 2003) (*I. ricinus* sensu stricto, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. granulatus*, *I. nuttallianus*, *I. minor*, *I. muris*, *I. affinis*, *I. pararicinus*, *I. jellisoni*, *I. gibbosus*, *I. nipponensis*, *I. persulcatus* et *I. pavlovskyi*). Ces deux complexes d'espèces sont bien distincts (figure 1):

- Le groupe *I. tasmani*, ou groupe d'Australie/Nouvelle-Guinée (Barker, Murrell, 2002), comprend trois espèces signalées en Australie, *I. tasmani* et *I. holocyclus* y étant même endémiques. De nombreuses études phylogénétiques ont mis en évidence à la fois la monophylie, et la position basale de ce complexe (Fukunaga *et al*, 2000; Klompen *et al*, 2000 ; Barker, Murrell, 2002) au sein du genre, appuyant ainsi l'hypothèse de la radiation des Ixodidae à partir de l'Australie (Gylfe *et al*, 2001; Barker, Murrell, 2002). Certains auteurs ont même décrit l'espèce *Ixodes uriae* comme appartenant à un genre distinct de la sous-famille Prostriata, *Ceratixodes* sp. (Camicas, 1998).

- Au contraire, si la monophylie du complexe *I. ricinus* demeure incertaine (Xu *et al*, 2003), il correspond à des espèces largement distribuées dans tout l'hémisphère Nord (voir 2.2) et qui auraient divergés plus récemment dans l'histoire du genre.

Ainsi, la comparaison d'*I. ricinus* et *I. uriae* doit tenir compte des différences qui peuvent séparer ces deux représentants du genre *Ixodes*.

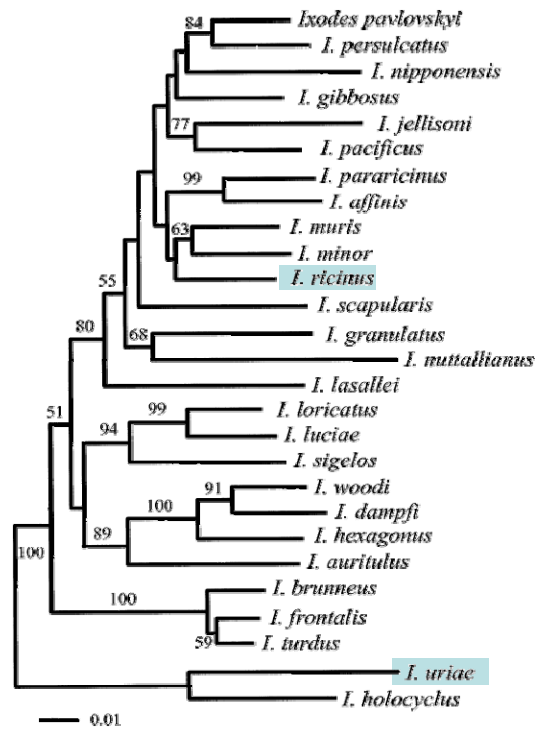


Figure 1. Relations phylogénétiques au sein des Ixodidae, d'après Xu et al. (2003). Les positions d'*Ixodes ricinus* et *I. uriae* sont surlignées en bleu.

2.2. Aire de répartition

La tique *Ixodes uriae* a été signalée dans de nombreuses colonies d'oiseaux marins, distribuées sur les côtes des deux hémisphères (figure 2). De par son cycle de vie et des capacités de mobilité autonome réduite (voir 2.3.), cette tique reste strictement inféodée aux nids de ses hôtes, et on ne la rencontre qu'à proximité.

Ixodes ricinus est abondante dans l'Europe « fraîche et froide » (Perez-Eid, 2007), plus particulièrement l'Europe centrale, et également sous forme de petites populations dans l'Europe méditerranéenne (figure 2). De par sa sensibilité à la dessiccation, on ne rencontre guère *I. ricinus* au-dessus de 1300-1500 m. d'altitude, sauf exceptions (peut-être 1700 m. dans les Pyrénées) (Perez-Eid, 2007). Cependant, des études suggèrent que *I. ricinus* serait en expansion au Nord de son aire de répartition, ou en altitude, sous l'influence des changements globaux (Danielova et al, 2006; Lindgren et al, 2000 ; Talleklint et Jaenson, 1998).

Dans les deux cas, et plus particulièrement pour *I. uriae*, il ne peut s'agir là que d'un aperçu général de la distribution de ces tiques, les données relatives étant lacunaires (McCoy, 2001).

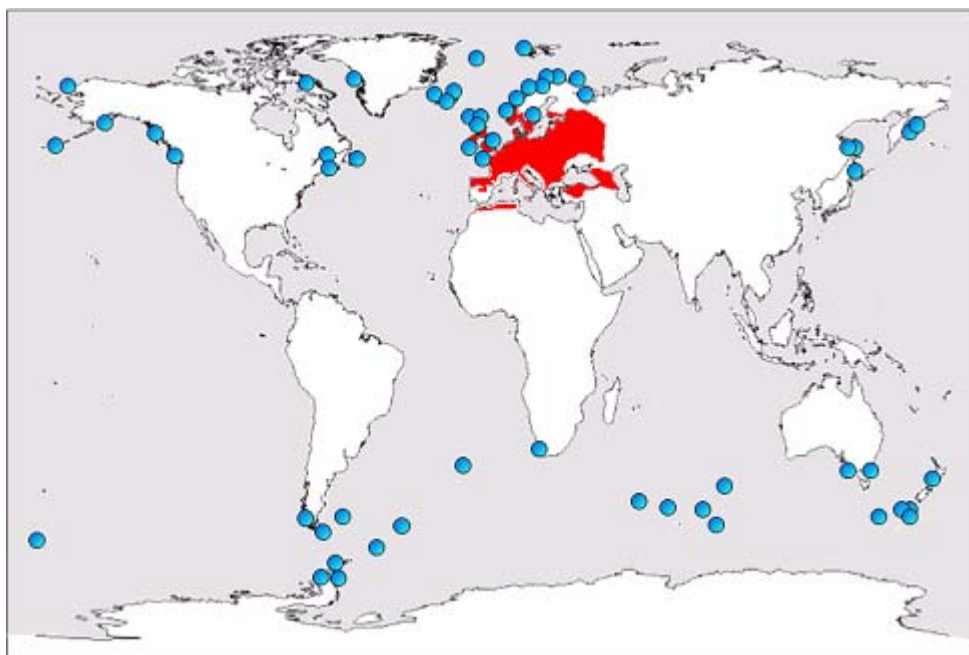


Figure 2.

Distributions connues d' *Ixodes ricinus* (en rouge, d'après Perez-Eid, 2007) et d'*I. uriae* (en bleu, d'après McCoy, 2001)

2.3. Cycle de vie

2.3.1. Généralités

Comme la plupart des tiques, *I. ricinus* et *I. uriae* sont des ectoparasites hématophages, gonochoriques (deux sexes), à reproduction sexuée stricte. On peut identifier quatre stades de développement, œuf, larve, nymphe et adulte (figure 3 & 4). Le développement est ponctué par deux mues. Un repas sanguin est nécessaire pour réaliser les deux premières mues, et un dernier est pris par la femelle avant la ponte (Eisen et Lane, 2002; McCoy, 2001). Chez *I. ricinus*, le mâle adulte peut occasionnellement prendre également un repas sanguin, mais sans se gorger (Gern, Humair, 2002). Les repas durent entre deux et 14 jours, selon le stade et l'individu.

Le cycle de vie complet s'effectue théoriquement en 3 ans (figure 3 & 4). Cependant, la durée observée varie entre 2 et 5 ans pour *I. ricinus* (Eisen et Lane, 2002), 2 et 8 ans pour *I. uriae* (Muzaffar et Jones, 2007), en fonction des conditions locales de l'environnement (disponibilité des hôtes, conditions climatiques). Durant leur vie, les deux tiques ne passent donc qu'un temps limité sur leurs hôtes pour leurs repas sanguins (i.e. de l'ordre de 5%, Eisen et Lane, 2002).

La copulation peut avoir lieu hors de l'hôte, c'est à dire au sol ou sur la végétation pour *I. ricinus*, autour du nid de l'oiseau hôte chez *I. uriae* (Kiszewski *et al*, 2001;). Elle peut également

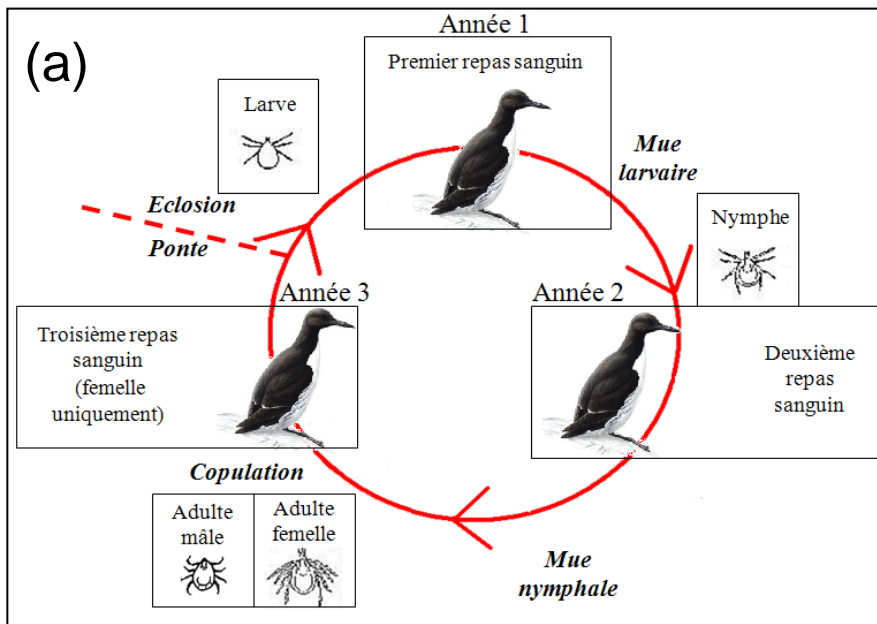


Figure 3.

Le cycle de vie d'*Ixodes uriae* (a) Un schéma du cycle de vie complet (McCoy, 2001) (b) Femelle adulte, nympe et larve gorgée (c) Individus de différents stades trouvés près d'un nid (photographies: http://www.units.muohio.edu/cryolab/education/antarcticbestiary_terrestrial.htm).

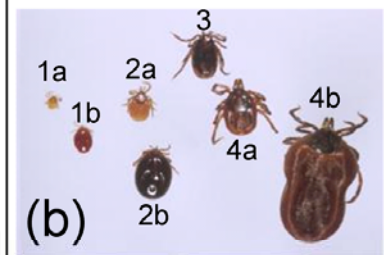
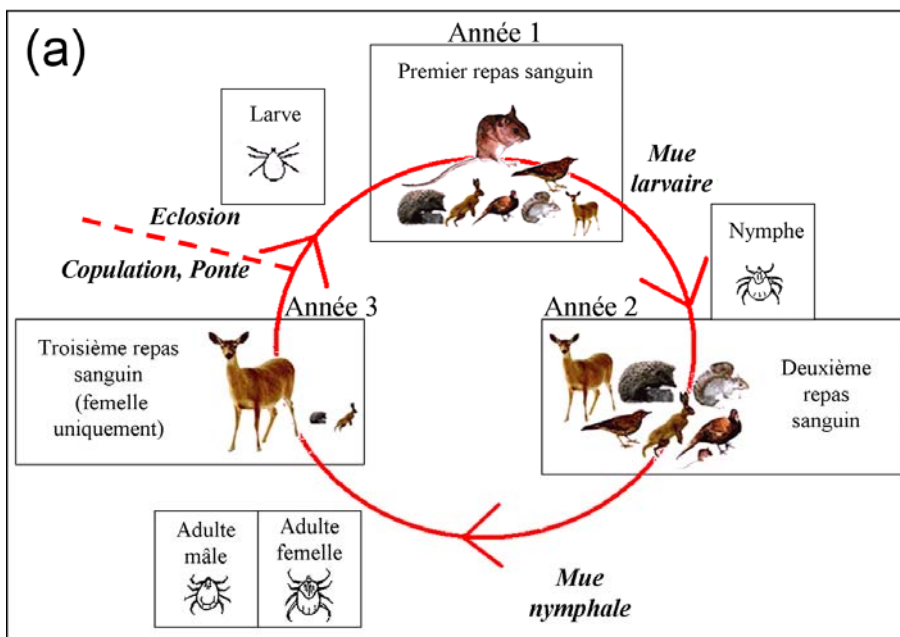


Figure 4.

Le cycle de vie d'*Ixodes ricinus* (a) Un schéma du cycle d'après Eisen et Lane (2002). Pour chaque stade, la distribution des tiques entre les principaux hôtes est figurée par la taille de la photographie de cet hôte. Les espèces hôtes figurées sont les rongeurs, passereaux, écureuils, faisans, insectivores, lagomorphes, chevreuils. (b) Les différents stades d'*Ixodes ricinus* : 1a&b - larve gorgée et non gorgée; 2a&b - nympe gorgée et non gorgée; 3 - mâle adulte; 4a&b - femelle adulte non gorgée et gorgée (photographie: <http://www.nhc.ed.ac.uk/index.php?page=24.25.119>) (c) Femelle adulte à l'affut (photographie: <http://www.maladies-a-tiques.com/Les-tiques.htm>).

avoir lieu sur l'hôte chez *I. ricinus* (Kiszewski *et al*, 2001), mais pas chez *I. uriae* (McCoy et Tirard, 2002) ; en cas de spécialisation, la rencontre des partenaires liés à un même hôte pourrait être favorisée par un appariement assortis indirect (i.e. copulation différée après la rencontre de l'hôte chez *I. ricinus*, association à un nid dans tous les cas chez *I. uriae*).

2.3.2. Quel individu hôte? La stratégie de rencontre

Certains taxons emploient une stratégie de chasse active des hôtes (e.g. des Ixodidae comme *Hyalomma* sp., *Amblyomma* sp.). Cependant, dans la majorité des cas, les tiques sont passives: soit elles demeurent à l'abri du nid d'un individu hôte (i.e. nidicole), soit elles attendent le passage des hôtes à l'affût dans la végétation (Sonenshine, 1993). Chez ces tiques, la première paire d'appendices regroupe de nombreuses fonctions sensibles impliquées dans la détection de l'hôte (Sonenshine, 1993) telles que la sensibilité aux vibrations, à la chaleur corporelle, à l'ombre et aux kairomones (i.e. substances chimiques attractives émises par l'hôte; Crooks et Randolph, 2006).

Ixodes uriae est typiquement une tique *nidicole*; on peut la trouver en abondance dans les nids où dans des anfractuosités dans l'immédiate proximité de ceux-ci (figure 3). Malgré la relative passivité d'*I. uriae*, la rencontre des hôtes est rendue possible par la formidable densité des colonies d'oiseaux marins (jusqu'à 40 individus/m² pour certaines espèces ;Barton *et al*, 1996) et la fidélité de ces oiseaux au site de leur naissance et à leur nid (i.e. philopatrie) qui peut favoriser la transmission verticale des tiques.

Ixodes ricinus utilise quant à elle la stratégie d'embuscade (figure 4), c'est une tique *non-nidicole*. En position d'embuscade, la tique est positionnée à l'extrémité de la végétation, la première paire d'appendices déployées, la rencontre se produisant quand l'hôte passe à proximité.

2.3.3. La vie sans ou avec l'hôte: périodes d'activité, périodes de repos

La vie de la tique sans l'hôte est partagée entre les périodes d'activité (recherche des hôtes) et périodes de repos, ou diapause. De plus, on distingue encore la diapause « morphogénétique » qui précède immédiatement une étape du développement (mue, ponte), de la diapause « comportementale » (la tique refuse l'opportunité d'un repas sanguin) (Sonenshine, 1993).

Ixodes uriae Pour les tiques nidicoles, la variation des conditions du milieu est réduite, et les patrons de diapause sont davantage liés à la synchronisation avec l'activité des hôtes (Sonenshine, 1993). Ainsi, chez *I. uriae*, il a été montré récemment que ses périodes d'activité dans une colonie de macareux étaient liées à celle d'éclosion des poussins (Muzaffar et Jones, 2007).

Ixodes ricinus Les stimuli qui déterminent l'état de diapause ou d'activité sont mal connus. Mais chez l'espèce voisine *Ixodes persulcatus*, le signal serait la température du sol (Alekseev *et al*, 2000). Cette relation aux conditions environnementales dessine le plus probablement les patrons d'activité annuelle d'*Ixodes ricinus*: on n'observe généralement *Ixodes ricinus* en activité qu'au printemps et en automne (Eisen et Lane, 2002; Sonenshine, 1993). Pour Sonenshine (1993), les patrons complexes de diapause permettent la synchronisation avec les périodes environnementales favorables.

2.3.4. Quelle espèce hôte ?

Un large spectre d'hôtes *Ixodes uriae* est un parasite des oiseaux marins coloniaux des deux hémisphères. Guiguen (1988) signale plus de 50 d'espèces hôtes possibles. De façon similaire, *Ixodes ricinus* est rencontrée sur un large spectre d'hôtes, incluant mammifères, oiseaux terricoles et reptiles. Aeschlimann dénombre plus de 300 espèces hôtes en Suisse (Aeschlimann, 1972) (voir figure 4 pour les principaux hôtes).

Opportunisme ou spécificité ? Classiquement, les espèces dites spécialistes ne sont rencontrées que sur une espèce hôte unique, voire un genre unique. A ce titre, les deux espèces modèles ont été considérées comme des tiques généralistes.

- Cependant, l'étude de la répartition de l'information génétique d'*I. uriae* a permis de remettre en cause cette nature généraliste. Il a été montré que, dans plusieurs colonies d'oiseaux plurispécifiques des deux hémisphères, les tiques rencontrées sur chacun des hôtes correspondent à des populations différenciées génétiquement (McCoy *et al*, 2001; 2005). *Ixodes uriae* aurait donc divergé en différentes races spécialisées sur différents espèces d'hôtes.

- Aucune étude génétique comparable n'a été réalisée à ce jour chez *I. ricinus*. Mais on observe en apparence une préférence d'hôtes par stade (figure 4): les stades juvéniles sont rencontrés majoritairement sur les petits mammifères, oiseaux bien qu'également sur des hôtes de grande taille comme le chevreuil (Perez-Eid, 2007). En revanche, les tiques adultes sont surtout rencontrées sur les hôtes de grande taille. Pour Perez-Eid (2007), ces patrons d'infestation par stade s'expliqueraient simplement par le problème que pose la fixation d'un adulte gorgé (jusqu'à 2 cm.) sur un hôte de petite taille. Meljon & Jaenson (1997) ont montré une corrélation entre stade et hauteur de la station dans la végétation. Ainsi, la préférence d'hôte apparente par stade chez *I. ricinus* a été considérée comme la conséquence de contraintes écologiques et mécaniques qui réduisent le spectre réel des différents stades. Cependant, chez *I. ricinus* une autre étude a

montrées expérimentalement que les taux d'infestation de différentes espèces hôtes pourraient également être liés à une préférence d'hôtes (Nilsson et Lundqvist, 1978).

2.4. Ecologie d'*Ixodes ricinus* et d'*I. uriae*

2.4.1. Interactions avec le milieu

Ixodes uriae Les colonies d'oiseaux marins habitées par *I. uriae* sont situées près des régions polaires. Les espèces qui affrontent les froids extrêmes doivent résoudre le problème de la conservation de l'eau: cependant, aucune des adaptations prévisibles ne peut être mise en évidence chez *I. uriae* (Benoit, 2007). La limitation des pertes d'eau est encore une fois permise par différentes adaptations comportementales: durant les périodes de repos, *I. uriae* s'aggrave en groupes de plusieurs milliers d'individus dans les anfractuosités du sol – ce qui favoriserait la conservation de l'eau (Benoit, 2007; Eveleigh et Threlfall, 1974). La présence de ces micro-habitats favorables est donc cruciale pour le maintien des populations de tiques et peut aussi favoriser les contacts entre tiques associés à différents nids.

Ixodes ricinus A l'échelle macro- et méso- climatique, la distribution d'*Ixodes ricinus* semble bien expliquée par les conditions hygrométriques: en climat océanique humide (îles britanniques), elle abonde en prairie, tandis qu'elle semble rechercher l'humidité du sous-bois en climat méso-humide (Europe centrale) (Perez-Eid, 2007). L'approche physiologique a de fait mis en évidence que la survie d'*I. ricinus* est ainsi possible pour des taux d'humidité relative supérieurs à 80% (Lees et Milne, 1951). Cette sensibilité à l'hygrométrie explique l'activité saisonnière des tiques (voir 2.3.2), et les allers-retours fréquents entre la litière et la végétation lors des périodes d'activité (Perret *et al*, 2003).

2.4.2. Interactions avec l'hôte

L'infestation par les tiques peut sévèrement affecter la santé d'un individu hôte (*I. ricinus* :Talleklint et Jaenson, 1997; *I. uriae* : McCoy *et al*, 2002). A l'échelle de la population, l'effet de l'infestation serait négligeable chez *I. ricinus*, (Talleklint et Jaenson, 1997), et important chez *I. uriae* (Boulinier et Danchin, 1996; Duffy, 1983). Le coût de l'infestation pourrait avoir favorisé l'évolution de défenses immunitaires innées des hôtes. Brossard & Wikel (2004) dénombrent ainsi de nombreuses études mettant en évidence l'activation de la réponse immunitaire innée (e.g., système protéique du complément, réaction inflammatoire) chez les hôtes lors de l'infestation par des tiques du complexe *I. ricinus*. L'infestation répétée favorise également

l'émergence d'une immunité acquise (Brossard et Wikel, 2004). En retour, cette réaction de l'hôte active des contre mesures par la tique (Brossard et Wikel, 2004; Couvreur *et al*, 2008). Ainsi, malgré la brièveté apparente de leur interaction, un intense dialogue moléculaire a lieu à l'interface tique/hôte. Ceci pourrait favoriser l'émergence de la spécificité d'hôte chez les tiques (Magalhaes *et al*, 2007; Mans et Neitz, 2004).

2.4.3. Interactions avec les conspécifiques

Chez les parasites, la distribution des individus dans l'espace est typiquement non uniforme (Shaw et Dobson, 1995). Chez les Ixodidae en particulier, Kiszewski *et al.* (2001) distingue l'agrégation hors de l'hôte, sur l'hôte mais non liée au sexe, et sur l'hôte liée au sexe. Les signaux de l'agrégation seraient des composés contenus dans les fèces des hôtes ou les phéromones sexuelles de la tique (Grenacher *et al*, 2001; Healy et Bourke, 2008). Différents facteurs ultimes peuvent expliquer l'émergence de ces comportements: l'agrégation pourrait être liée à la découverte de sites favorables pour la rencontre des hôtes (Healy et Bourke, 2008), la rencontre des partenaires sexuels, la maintenance des conditions micro-environnementales (voir 2.4.1) ou la minimisation de la mortalité due aux prédateurs (e.g., arthropodes, Healy et Bourke, 2008) .

2.4.4. Dispersion

Pour de nombreux auteurs, la dispersion autonome dans le genre *Ixodes sp.* est de l'ordre du mètre (Falco et Fish, 1991); les mouvements des hôtes durant le repas sanguin jouent donc un grand rôle dans la dispersion des tiques.

Chez *I. uriae*, la dispersion à longue distance a deux limites majeures. D'une part, en période de reproduction, les oiseaux sont extrêmement attachés à leur nid (Coulson et Nève de Mévergnies, 1992). D'autre part, en dehors des périodes de reproduction, les oiseaux vivent en mer et la probabilité pour la tique de rester attachée durant cette période, ou de se détacher de son hôte dans un environnement favorable, est hautement improbable (McCoy, 2001). En revanche, il a été proposé que les comportements d'exploration des oiseaux jeunes ou des reproducteurs en échec permettraient la dispersion des tiques entre les colonies (Danchin, 1992; McCoy, 2001).

Chez les espèces du complexe *I. ricinus*, les oiseaux migrateurs joueraient un rôle important dans la dispersion à longue distance (De Meeûs *et al*, 2002; Aeschlimann, 1981). Cependant, l'observation d'une différenciation génétique entre les populations Suisses et Tunisiennes par De Meeûs *et al.* (2002) montre que ces capacités de dispersion à l'échelle intercontinentale restent limitées. A l'échelle d'une région, le sexe mâle semble disperser davantage. L'une des hypothèses

avancées est celle d'une spécificité d'hôtes liée au sexe chez *I. ricinus*, les femelles ayant une préférence pour des hôtes d'une plus faible mobilité, comme les micromammifères (De Meeûs *et al*, 2002).

2.5. Rôle de vecteur d'*Ixodes ricinus* et *I. uriae*

2.5.1. Des vecteurs de nombreux pathogènes

Les tiques représentent les deuxième vecteurs de maladies humaines après les moustiques (Parola et Raoult, 2001; Troughton et Levin, 2007) et posent également des problèmes vétérinaires considérables (Sonenshine, 1993). En effet, la liste des pathogènes portés par *I. ricinus* et *I. uriae* seules est considérables (tableau I) et soulignent l'importance de mieux comprendre le fonctionnement et l'évolution de ces vecteurs. Il est à noter que, parmi ces nombreux pathogènes, *I. ricinus* et *I. uriae* sont tous les deux vecteurs des bactéries responsables pour la maladie de Lyme chez l'homme.

2.5.2. *I. ricinus* et *I. uriae* dans l'épidémiologie de *B. burgdorferi* s.l.

Borrelia burgdorferi s.l. est un complexe incluant à ce jour environ 14 espèces (Derdáková et Lenčáková, 2005 ; Postic *et al*, 2007; Richter *et al*, 2004), dont quatre au moins sont les agents de la borréliose de Lyme, la principale maladie à vecteur d'Europe et d'Amérique du Nord (Barbour et Fish, 1993). Le tableau clinique de l'infection par *B. burgdorferi* s.l. peut inclure de nombreux symptômes (dermatiques, neurologiques, cardiaques, articulaires), selon l'espèce infectante et le génotype de l'hôte (Stanek *et al*, 2002). Bien que cette maladie soit rarement létale, ses manifestations chroniques la rendent d'une grande importance économique (Gubler, 1998).

A ce jour, six des 14 espèces de *B. burgdorferi* s.l. ont été détectées en Europe chez *I. ricinus* (Hanincova *et al*, 2003), et trois chez *I. uriae* (tableau I). *I. ricinus* est le principal vecteur de *B. burgdorferi* s.l. en Europe, bien que d'autres vecteurs aient été identifiés (*I. hexagonus*, *I. uriae*) (Eisen et Lane, 2002). Du fait de sa large distribution, *I. uriae* est potentiellement impliquée dans la circulation transhémisphérique de *B. garinii*, voire de sa transmission à l'homme (Gylfe *et al*, 1999; Olsen *et al*, 1995). Les deux espèces que nous étudions sont donc d'une importance majeure dans l'épidémiologie de la maladie de Lyme.

Tableau I. Principaux agents pathogènes transmis ou détectés chez *I. ricinus* et *I. uriae*

Tique	Pathogène		Détectée chez la tique	Compétence vectorielle	Référence	Pathogène humain	Référence
	Règne	Espèce					
<i>I. uriae</i>	Bactéries	<i>B. burgdorferi s.s.</i>	×	suggérée	(Duneau <i>et al.</i> , 2008)	×	e.g.(Kurtenbach <i>et al.</i> , 2002)
		<i>B. garinii</i>	×	suggérée	(Olsen <i>et al.</i> , 1993)	×	e.g.(Kurtenbach <i>et al.</i> , 2002)
		<i>B. lusitaniae</i>	×		(Duneau <i>et al.</i> , 2008)	×	e.g.(Kurtenbach <i>et al.</i> , 2002)
	Virus	TBE virus	×		(Chastel, 1988)	×	e.g. (Süss, 2003)
		Tyuneliy virus	×		(Chastel, 1988)	×	(Chastel, 1988)
<i>I. ricinus</i>	Bactéries	<i>B. burgdorferi s.s.</i>		×	(Dolan <i>et al.</i> , 1998)	×	e.g.(Kurtenbach <i>et al.</i> , 2002)
		<i>B. afzelii</i>		×	(Dolan <i>et al.</i> , 1998)	×	e.g.(Kurtenbach <i>et al.</i> , 2002)
		<i>B. garinii</i>		×	e.g.(Fiseroova <i>et al.</i> , 2008)	×	e.g.(Kurtenbach <i>et al.</i> , 2002)
		<i>B. valaisiana</i>	×		e.g. (Alekseev <i>et al.</i> , 2001)		
		<i>B. lusitaniae</i>	×		e.g. (Ras <i>et al.</i> , 1997)	×	(Collares-Pereira <i>et al.</i> , 2004)
		<i>B. spielmani</i>	×		(Richter <i>et al.</i> , 2004)		
		<i>Anaplasma sp.</i>		×	e.g. (Eisen et Lane, 2002)	×	(Dawson <i>et al.</i> , 1991)
		<i>Bartonella henselae</i>		×	(Cotté <i>et al.</i> , 2008)	×	(Anderson et Neuman, 1997)
		<i>Rickettsia sp.</i>		suggérée	(Fournier <i>et al.</i> 2000)	×	(Nilsson <i>et al.</i> , 1999)
	Protozoaires	<i>Trypanosoma theileiri</i>		suggérée	(Aeschlimann <i>et al.</i> 1979)		
		<i>Babesia divergens</i>		×	e.g. (Eisen et Lane, 2002)	×	(Zintl <i>et al.</i> , 2003)
	Nématodes	<i>Dipetalonema rugosicauda</i>	×		(Aeschlimann <i>et al.</i> 1979)		
	Virus	TBE Virus		×	e.g. (Eisen et Lane, 2002)	×	e.g. (Süss, 2003)
		LIV Virus		suggérée	(Hudson <i>et al.</i> , 1995)	×	(Davidson <i>et al.</i> , 1991)

2.5.3. Interactions hôte/tique/*B. burgdorferi* s.l.

Interaction borrélie-tique Les mécanismes moléculaires de la distribution des borrélies parmi les tiques ont fait l'objet d'une abondante littérature (e.g., Eisen et Lane, 2002). Tout indique que la tique est un acteur de la transmission du pathogène: ainsi, au moins une protéine contenue dans la salive des tiques joue un rôle dans le succès de l'infection de l'hôte (Fikrig et Narasimhan, 2006; Ramamoorthi *et al*, 2005) . Du point de vue de la tique, l'association pourrait avoir des effets négatifs d'après certains travaux (e.g. une mobilité réduite, Alekseev, 2000 ; voir aussi Lefcort, 1996; Qiu, 1997), mais pourrait également induire aussi des bénéfices pour la tique (e.g. une plus grande aptitude à rencontrer les hôtes, Faulde et Robbins, 2008). Ainsi, on peut imaginer que la forte compétence vectorielle d'*Ixodes sp.* pour *B. burgdorferi* s.l. est le fruit de sélections réciproques.

Interaction hôte-borrélie Les patrons de répartition de la borrélie parmi les hôtes vertébrés sont basés sur des associations spécifiques : par exemple, *B. valaisiana* et *B. garinii* sont principalement associés aux oiseaux. Du point de vue du pathogène, l'hôte auquel elle sera transmise par la tique n'est donc pas anodin. Pour Kurtenbach et al. (2002), ces associations sont la conséquence de patrons variables de défense immunitaire innée entre les différents hôtes. D'après ce modèle, les tiques ne jouent aucun rôle dans la formation des patrons de spécificité hôte/borrélie.

Par ailleurs, De Meeûs et al. (2004a) observent une plus forte différenciation génétique parmi les tiques *Ixodes ricinus* infectés par *B. afzelii*. Ils proposent plusieurs explications alternatives, allant de l'existence d'une espèce cryptique d'*I. ricinus*, moins vagile, ayant une meilleure compétence vectorielle pour *B. afzelii*, à une possible manipulation parasitaire des tiques par la borrélie, en passant par une mortalité plus importantes des tiques dispersantes infectées par cette bactérie. De telles hypothèses n'ont jamais été testées directement. L'étude de la structure génétique des populations d'*Ixodes ricinus*, la répartition de sa diversité génétique entre ses différents hôtes et à différentes échelles pourrait permettre d'explorer plus avant ces aspects de l'épidémiologie de *B. burgdorferi* s.l. (Gooding, 1996 ; McCoy, 2008).

3. Questions abordées

Après avoir donné cet aperçu de la biologie de base et de l'écologie des deux espèces modèles, nous allons aborder les aspects suivants de la spécialisation chez *I. ricinus* et *I. uriae* :

***Ixodes uriae*: l'évolution récurrente des races d'hôtes.**

Dans le contexte d'un parasite spécialisé pour plusieurs espèces hôtes, comme *I. uriae*, nous pouvons formuler deux hypothèses alternatives sur la répartition de l'information génétique entre les espèces hôtes: congruence entre espèces hôtes exploités et phylogénie des tiques (figure 5a); congruence entre localisation géographique et phylogénie des tiques (figure 5b).

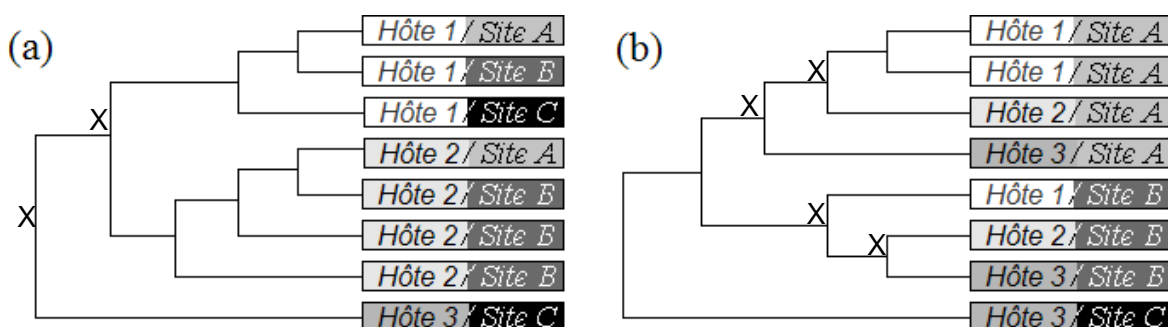


Figure 5

Schéma des patrons phylogéographiques attendus (a) dans le cas d'une évolution ancienne des races d'hôtes. Chaque feuille de cet arbre phylogénétique représente un groupe d'individus, caractérisé par son site d'origine (A, B ou C) et l'hôte sur lequel il a été échantillonné (1, 2 ou 3) (b) dans le cas d'une évolution récurrente des races d'hôtes dans différents sites. Les évènements de séparation entre races d'hôtes (sous le scénario d'évolution le plus parcimonieux) sont figurés par des croix.

Les patrons d'évolution conformes à l'hypothèse (5a) ont été trouvés dans les études génétiques précédentes sur *I. uriae* basée sur l'utilisation de marqueurs microsatellites (McCoy *et al*, 2001; 2005). Du fait de leur rapidité d'évolution, et la rapide saturation des différences par homoplasie (i.e., identité des allèles par convergence), les marqueurs microsatellites révèlent l'évolution récente. Nous avons dans un premier temps validé l'existence de races dans un nouvel échantillonnage réalisé en Islande, à l'aide des mêmes marqueurs. Par ailleurs, à l'aide de marqueurs mitochondriaux à évolution plus lente, nous pouvons nous attendre à valider l'une ou l'autre des hypothèses (5a) et (5b). Ceci permettra de discriminer qui de l'émergence ancienne des races d'hôtes, issu d'un processus coévolutif ancien, ou d'un phénomène rapide et récurrent d'évolution d'émergence races d'hôtes locales. Cette étude s'intègre donc à la fois dans le champ de la génétique des populations et de la phylogéographie intraspécifique (Avice, 1987).

Les résultats de ce travail sont présentés dans le manuscrit intitulé «*Recent evolution of host specialization in the seabird tick Ixodes uriae, a vector of Lyme borreliosis*», en préparation.

***Ixodes ricinus* suit-elle la même tendance qu’*I. uriae*?**

Durant notre étude, nous avons abordé trois aspects différents de la génétique des populations d’*I. ricinus* en rapport avec sa spécialisation potentielle. Les travaux précédents sur la génétique de populations d’*I. ricinus* ont révélés l'existence de très forts déficits en hétérozygotes par rapports aux attendus sous l'hypothèse de panmixie locale, déficits en hétérozygotes imparfaitement expliqués par les allèles nuls et/ou la dominance d'allèles courts (De Meeûs *et al.* 2004a). L'existence d'un effet Wahlund ne pouvant être exclu. Il nous est apparu pertinent de tester cette hypothèse selon trois modalités: une très indirecte en recherchant l'existence d'appariement assortis entre mâles et femelles, la seconde en recherchant plus directement des sous-groupes (*mixture analysis*) par une méthode bayésienne et enfin une troisième en génotypant des tiques prélevées sur différentes espèces hôtes afin de tester directement l'existence de possibles races d'hôtes chez cette espèce de tique.

Appariement assorti chez *Ixodes ricinus*

Chez les organismes sexués, les génotypes sont produits par la ségrégation, la recombinaison et l’union des gamètes. La mise en place de mécanismes d’isolement reproducteur est un élément clé de la diversification des organismes sexués, et en particulier de leur spécialisation. En effet, si une combinaison aléatoire de gènes peu rendre un individu particulièrement adapté à un hôte donné, la pérennité de cette combinaison est remise en cause par le brassage de la reproduction sexuée. Les mécanismes d’isolement reproducteur sont de différents types. Nous avons utilisé ici «appariement assorti» dans le sens où nous avons supposé que, dans un même site, les tiques ne s’apparient pas de façon aléatoire, mais selon leur apparentement, mesuré à l’aide marqueurs génétiques microsatellites. Nous avons donc supposé que s'il existait des races d'hôtes chez *I. ricinus*, la préservation de bonnes combinaisons de gènes devait être assurée par un appariement assorti (génétiquement parlant) des adultes. Ce travail est présenté dans l'article «*Assortative Pairing in Ixodes ricinus L. (Acari: Ixodidae), the European Vector of Lyme Borreliosis*» (Kempf *et al.*, J. Med. Entomol., sous presse).

Nouveaux aspects de la génétique des populations d’*Ixodes ricinus* par une approche bayésienne.

Un jeu de données «anciennes» déjà publié (De Meeûs *et al.* 2002) a été ré-étudié à l’aide d’une méthode de détection des sous-populations, récemment développée et implémentée par le

logiciel BAPS 5.1. (Corander *et al*, 2004). Cette méthode a été utilisée parallèlement pour un vaste jeu de données sur *I. uriae* issus des travaux précédents de McCoy *et al*. (McCoy *et al*, 2001; 2003; 2005) pour comparaison avec un jeu de données où l'espèce hôte est connue et la raciation d'hôte avérée.

Nous avons par la suite exploité ces résultats pour ré-étudier le biais de dispersion sexe-spécifique entre les sous-populations en présence d'un fort effet Wahlund. Ceci a permis de comparer différents tests utilisés.

Ce travail correspond au manuscrit d'un article soumis pour publication et intitulé «*Population structure, Wahlund effects and sex biased dispersal in Ixodes ricinus, the European vector of Lyme borreliosis: new tools for old data*».

***Ixodes ricinus* est-elle réellement un tique généraliste ?**

Cette dernière étude a été conçue de manière comparable aux travaux de McCoy *et al*. (McCoy *et al*, 2001; 2005) chez *I. uriae*. En effet, nous avons échantillonné les tiques *I. ricinus* sur des hôtes piégés dans le cadre d'autres études de biologie des populations. Ainsi, nous avons pu étudier des tiques infestant différentes espèces de rongeurs et d'oiseaux, et également des lézards verts, des chevreuils et des sangliers, à l'aide des outils de la génétique des populations. Plus particulièrement, nous avons étudié la répartition de l'information génétique entre les hôtes, toujours dans le cadre théorique de la validation/réfutation de l'hypothèse de l'existence de races d'hôtes chez cette espèce.

A cause de l'origine multiple des échantillons, nous avons dû analyser l'influence de différents paramètres sur la structuration des tiques : années d'échantillonnage, stades des tiques, sites, individus hôtes, et enfin le type d'hôte (sanglier, chevreuil, lézard, rongeur, oiseau). Nous nous sommes appuyés nous-mêmes sur une hypothèse de spécificité par type, car une spécialisation par espèce comparable à celle d'*I. uriae* semblait peu parcimonieuse étant donné le grand nombre d'espèces d'hôtes potentiellement présents en sympatrie pour *I. ricinus*. Les résultats de cette approche sont exposés dans le manuscrit d'article en préparation intitulé «*Is the European vector of Lyme borreliosis, tick Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae), a true generalist tick ?*».

4. *Ixodes uriae* :
l'évolution récente des races d'hôtes

4.1. *Recent evolution of host specialization in the seabird tick Ixodes uriae, a vector of Lyme Borreliosis* (en préparation)

Recent evolution of host specialization in the seabird tick

***Ixodes uriae*, a vector of Lyme borreliosis**

Florent Kempf^{*}, Thierry Boulinier[†], Thierry De Meeûs^{††}, Céline Arnathau^{*} and Karen D. McCoy^{*}

^{*}*Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses), UMR CNRS-IRD 2724, IRD, 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.*

[†]*Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS UMR 5175, 1919 Route de Mende 34293 Montpellier, France*

^{††}*Laboratoire de recherches et de coordination sur les Trypanosomoses, UMR177 IRD/CIRAD, TA A-17/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.*

Date of receipt:

Keywords: Microsatellites, Cytochrome oxidase III, host-parasite interactions, colonial seabirds, coevolution

Correspondence: Florent Kempf

GEMI, UMR 2724 CNRS/IRD

IRD, 911 Avenue Agropolis, B.P. 64501

34394 Montpellier, France

Tel: (33)4 67 41 62 54, Fax: (33)4 67 41 62 99

Email: florent.kempf@mpl.ird.fr

Running title: Recent evolution of host specialisation

Abstract

Ecological interactions are an important source of rapid evolutionary change and thus may generate a significant portion of novel biodiversity. Such changes may be particularly prevalent in parasitic organisms, where interactions with the host can induce strong selective pressure for adaptation. Indeed, several recent examples highlight the importance of host-associated divergence for the evolution of biodiversity. However, in order to understand the relative ease at which such divergences occur, it is essential to examine the evolutionary history of the divergence process, particularly when it is occurring over large geographic scales where both geographic and host-associated isolation may play a role. In the present study, we use population genetics and phylogeography to study the evolutionary history of host-associated divergence in the seabird tick *Ixodes uriae* (Acari, Ixodidae). To do this, we compared two types of genetic markers, microsatellite markers that reflect more ecological time scales and a conserved mitochondrial gene (Cytochrome oxidase III) that should reflect more ancient divergence events. Population structure based on microsatellite markers supported previous studies and showed clear evidence of host-associated divergence in all populations considered. However, different populations of the same host type did not always group together in overall analyses suggesting that races likely evolved independently several times. In contrast, little host-associated structure was found for the mitochondrial gene fragment: most variation was associated with geographic location and not host species. In line with previous work, these combined results suggest that host race formation in *I. uriae* is a recent phenomenon and that it has occurred repeatedly in different isolated regions. In addition to its implications for host population dynamics, rapid divergence in *I. uriae* may greatly modify the epidemiological landscape of the micropathogens that it transmits and raises the question of the existence of host-associated structure in other tick systems, particularly those of significant medical and economic interest.

Introduction

Historical debates on the evolution of genetic divergence have particularly addressed the role played by the different geographical arrangement of populations (i.e. allopatry, sympatry, peripatry, parapatry). Efforts have been made to draw a general picture of the interplaying processes (Kirkpatrick, Ravigné, 2002), and particularly to assess the possibility of divergence in the case of ongoing ecological interactions (Via, 2001). In addition to the spatial context of divergence, a growing amount of work now focuses on the pace and frequency of divergent evolution (Carroll *et al.* 2007; Schwarz *et al.*, 2005; Thompson, 1998; Yoshida *et al.*, 2003). Thus, some authors make the distinction between “ecological” (i.e. rapid) and “evolutionary” time scales of divergence (Gingerich, 2001). However, beyond a simple question of scale, this distinction highlights the importance of the underlying mechanisms and their long-term consequences. For example, ecological interactions are likely an important cause of rapid evolutionary changes (Orr, Smith, 1998), but these changes can in turn influence the dynamics of ecological interaction (Fussmann *et al.*, 2007).

Parasites are ideal model organisms to address the mechanisms and consequences of evolutionary divergence. Indeed, given that the host is the main component of a parasite’s environment, including both its food resource and its breeding site, and that this habitat is constantly changing, parasites may be particularly prone to ecological adaptation and divergence (De Meeûs *et al.*, 1998; Gandon, Van Zandt, 1998). Well-known case studies on phytophagous species have revealed the importance of host-associated divergences for the evolution of biodiversity (Drès, Mallet, 2002 ; Feder *et al.*, 2005), but ecological speciation is predicted to be a general tendency among parasitic species (De Meeûs *et al.*, 1998) and will depend on their life history characteristics (McCoy, 2003).

Facing entangled recent and ancient events acting at various spatial scales, the choice of adapted markers and methods of data analysis is of primary interest in order to understand the divergence process. Microsatellite markers are inherited biparentally and have relatively high mutation rates (Jarne, Lagoda, 1996). They are thus expected to reflect contemporary processes; size homoplasy is expected to suppress the signature of ancient events (e.g., (Howes *et al.*, 2006)). In contrast, detection of recent events using more conserved genetic markers can be limited by incomplete lineage sorting (i.e., the lineages may not yet reflect current population divergence), but can be used to investigate historical processes (Avice, 1998 ; Ballard, Whitlock, 2004). In this

study, we use population genetics and phylogeography to investigate the evolutionary history of host-associated divergence in the seabird tick *Ixodes uriae* (Acari, Ixodidae).

Ixodes uriae is a common hematophagous ectoparasite that exploits colonial seabirds in polar regions (Northern and Southern hemispheres). Although it was initially characterized as a seabird generalist given its extensive host range (Guiguen, 1988), microsatellite-based studies have shown evidence of host race formation within this species. Indeed, host-associated divergence in this tick has been demonstrated for several host species under sympatric conditions (McCoy *et al.*, 2001, 2005a). These observations call into question the habitat-centred hypothesis of tick evolution, whereby only the abiotic environment, and not the host, plays a significant role in tick adaptation (Klompen *et al.*, 1996), and suggest that the ecological interaction with the host could be of key importance in such species (Magalhaes *et al.*, 2007). However, to understand the relative ease at which such divergences occur, it is essential to understand the evolutionary history of the divergence process, particularly when it is occurring over large geographic scales where both geographic and host-associated isolation may play a role. Understanding the nature of host-associated adaptations is particularly important for organisms like ticks, as they are important vectors for numerous microparasites (Parola, Raoult, 2001), including the bacteria causing human Lyme disease *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Gern, Humair, 2002). Rapid divergence in ticks can greatly modify the epidemiological landscape of such important micropathogens (McCoy, 2008).

Previous studies showed evidence of host-associated divergence of *I. uriae* populations in seven colonies where different seabird species were breeding sympatrically (McCoy *et al.* 2001, 2005a). These results suggested that divergence of these local tick populations was spatially dynamic in nature. However, current gene flow between formerly isolated colonies and homoplasy may alter the signature of past events. In the present study, we first examined host-associated population structure at 8 microsatellite markers in four new colonies where two to four different seabird species breed sympatrically and compare this structure to two previously analysed colonies. We then studied how the phylogeographic relationships among ticks of four of these colonies relate to their host associations. In particular, our aim was to determine if host-associated tick races result from a few historical specialization events or whether specialization occurs repeatedly and independently at a more local scale.

Materials and methods

Sampling design

In 1998, 2001, and 2003, we collected ticks directly from their host in six different seabird colonies in the North Atlantic (Figure 1). These hosts included four host species living sympatrically in these localities: the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*, the Atlantic puffin *Fratercula arctica*, the common guillemot *Uria aalge* and the razorbill *Alca torda* (Table 1). Ticks were collected from as many host individuals as possible and were stored in 70-90% ethanol after collection.

DNA extraction

Mostly adult females and nymphal ticks were used for genetic analyses. Conserved ticks were washed three times in distilled water to remove any traces of ethanol and were cut in half. A piece was then placed in a 1.5mL tube with a steel bead, frozen using liquid nitrogen and ground with a mixer mill 301 (Retsch, Germany). DNA extractions on the ground product were then performed using the procedure outlined in the Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA).

Microsatellite markers: amplification, genotyping and data analysis

We analysed the distribution of genetic variation at eight microsatellite markers (McCoy, Tirard, 2000) from the ticks collected from the 6 colonies and 4 host species (total of 18 populations; Table 1). For the Icelandic ticks, PCR amplifications were performed as detailed by McCoy & Tirard (McCoy, Tirard, 2000) and were visualized using an automated sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA). This new data was put in relation with previously published data from sympatric tick populations collected on Fair Isle, United Kingdom and Hornøya, Norway (McCoy et al. 2005a).

The independence between all pairs of loci was tested using the software Genepop v. 3.4 (Raymond, Rousset, 1995). Significance levels were corrected using sequential Bonferroni's correction for multiple tests (Rice, 1989). Genetic variability was assessed using Nei's unbiased estimator of heterozygosity H_s (Nei, 1987). All populations were tested for departure from Hardy-Weinberg equilibrium in allelic frequencies. This test compared Weir & Cockerham's (1984) unbiased estimator of Wright's F_{IS} (Weir, Cockerham, 1984; Wright, 1965) for each population to its chance distribution resulting from the randomization of alleles among individuals within

samples (15,000 permutations). These computations were performed using FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

Next, we assessed whether ticks were locally structured among host species within each of the colonies examined. First, pairwise differentiation among local host-related groups was calculated using Wright's F_{ST} (Wright 1965) following Weir & Cockerham's (1984) approach. This estimate was compared to the chance distribution resulting from the randomization of individuals among colony samples (15,000 permutations). For these computations, we used the software FSTAT version 2.9.3.2. We then examined the general structure within and among colonies using a principal component analysis to summarize and visualize the data. This analysis was carried out using the software PCA-GEN version 1.2 (Goudet, 1999) (10,000 randomizations). To assess the robustness of groups, we assessed the likelihood of correct assignment of the ticks to their originating host-related group given their multi-locus genotype, without explicit consideration of the geographic location. We used the assignment criterion proposed by Cornuet *et al.* (1999), and the associated test implemented in the software GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004).

mtDNA : Amplification, sequencing and data analyses

Ticks from HR, LT, GR, FI and HO (Figure 1) were selected for mtDNA sequencing (Table 1). We amplified a fragment of the mitochondrial gene COIII (cytochrome oxidase, subunit III) using primers IuCO3F (5'-CGT GAA GCC TCT TTT CAA GG-3') and IuCO3R (5'-TCA TGC TGC AGC TTC AAA TC 3') designed using the complete mitochondrial genome sequence of *I. uriae* (Shao *et al.* 2005, NC 006078). The 50 μ L PCR reaction mix contained 5 μ L 10x buffer (Tris-HCl, pH 9.0, KCl, Triton_X-100), 4 μ L MgCl₂ (25mM), 4 μ L dNTP (2.5 mM), 1 μ L of each primer, 1 U Taq polymerase (Promega), 20 ng DNA, and distilled water. The PCR amplification procedure began with an initial denaturation step (95°C, 5min), followed by 30 cycles of denaturation (94°C, 40s), annealing (48°C, 30s), and extension (72°C, 1min30s), and ended with a final extension step (72°C, 5mins). The PCR-products were visualized on 2% agarose – ethidium bromide gels; positive amplifications were sent for direct sequencing (Genome Express, Meylan, France). The chromatographs of all sequences were manually verified and sequence alignment was checked using the software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

Phylogeographical interpretations can be deeply influenced by non-neutral evolution at the locus of interest (Ballard, Whitlock, 2004). We therefore assessed the neutrality of COIII using the tests of Tajima (1989) and McDonald & Kreitman (1991). To calculate the latter, we used the COIII sequence of *Ixodes pacificus* (Kain *et al.*, 1999); AF082986). Both tests were performed using DNASP v.4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003).

For each population, we computed the haplotype and nucleotide diversity (Nei, 1987) and the average pairwise difference (Tajima, 1989) between individuals, using DNASP (Rozas *et al.*, 2003). We tested for differences in these observed values among populations of each host type (e.g., genetic diversities among the four populations of kittiwake ticks) using Wilcoxon rank-sum tests performed with the software S-PLUS 2000 Professional release 2 (MathSoft, Inc.). Ticks collected on razorbills were removed from this analysis in order to consider only populations of comparable sizes (see Table 1).

In order to better understand evolutionary history of *Ixodes uriae* populations, we next performed a nested clade analysis (Templeton, 1998). Gene genealogies were inferred using the software TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Ambiguities in the resulting cladograms (i.e. loops) were resolved by applying the criteria described by Pfenninger & Posada (Pfenninger, Posada, 2002). Nesting categories were identified following the rules purposed by Templeton (Templeton, 1998). The distribution of haplotypes among host types was analysed two ways. First, we considered either the host or the geographical location as a categorical variable, and tested for an association between geography, host use, haplotypes/clade within each nesting clade, using a permutational contingency test implemented in Geodis 2.5. (Hudson *et al.*, 1992; Posada *et al.*, 2006). Second, for each nested clade, we computed the NCA distances based on geographical distances among populations (i.e. the clade and nested clade distance D_c , D_n for each of the nested haplotypes/clade, and the global interior versus tip statistic of D_c and D_n). These distances and their significance, estimated using a Monte Carlo procedure (Posada *et al.*, 2006) were interpreted following Templeton's inference key (Templeton, 2004).

Results

Microsatellite markers

All possible pairs of loci were in linkage equilibrium. Three populations showed slight deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (PF ticks in HR; CG ticks in FI; PF ticks in HO), but none were significant after correction for multiple tests. The overall F_{IS} across populations was low, but statistically significant ($F_{IS}=0.052$, $P<0.0001$).

At the within colony level, there was evidence for significant differentiation among ticks sampled from different sympatric host species, except for ticks from razorbills which tended to be similar to the other local populations (Table 2). This pattern was confirmed by PCA analyses (Figure 2); tick populations grouped principally by host species with razorbill ticks falling in with other host groups. Interestingly, ticks sampled from guillemots formed two isolated groups based on the two PCA axes, one that included the western Iceland population (LT) and the more southerly Scottish population of Fair Isle (FI), and another that included the northern and eastern Iceland populations (GR, SK) and the colony in northern Norway (HO). Assignment analyses of individual ticks echoed these results. Razorbill ticks had a relatively low probability of being correctly assigned to their host group and their presence lowered the assignment success of the other tick races. When these populations were removed, host-associated assignment success greatly improved (Table 3). Support for a single group of Kittiwake ticks was relatively low, falling in line with previous results that suggest a lower rate of between colony dispersal in this race and the independent evolution of divergent races in different colony groups (McCoy *et al.* 2005a).

mtDNA : Sequence diversity and haplotype distribution

We observed 39 variable sites in a 463 bp-length fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase III-subunit. Forty-nine haplotypes were found among the 257 ticks sequenced (Genbank numbers EU849503-EU849551). The hypothesis of neutral evolution of the COIII gene fragment considered could not be rejected (Fisher's exact test: P -value = 0.73; G-test with Yates's correction: P -value = 0.60).

The degree of genetic variation did not differ clearly among the different host-associated groups (Table 1): we only observed a significant difference in nucleotide diversity and mean number of pairwise differences between guillemot and puffin ticks (Wilcoxon rank sum test: rank-sum statistic $W = 25$, P -value = 0.0286). There was no significant difference among tick groups in the number of haplotypes (P -value > 0.106).

The cladogram of all haplotypes (Figures 3, 4) was supported by a maximum parsimony probability greater than 95% (see (Templeton *et al.*, 1992) for details). All cladogram ambiguities were resolved according to Pfenninger & Posada's criteria (Pfenninger, Posada, 2002) (disregarded relations were represented as dotted lines on figures 3, 4). First, the connections between several haplotype pairs (H33-H1, H36-H38, H31-H49, H3-H21) had little support from the different criteria used (i.e., geographical, topological and frequency criteria). The relationship between H2 and H11 was more strongly supported than the alternative between H10 and H11 (i.e., topological and frequency criteria favoured the H2-H11 link whereas the geographical criterion favoured the H10-H11 link). The most abundant haplotypes were H1 and H2 (representing respectively 37.7% and 22.9% of all individuals). Most of the other haplotypes radiated from H1 and H2 via a single step connection or by haplotypes with an intermediate abundance.

In general, the different haplotypes were homogenously distributed among the host-associated tick groups (Figure 3). Although only 11 of the 49 haplotypes were shared among groups, these haplotypes represented the majority of the collected ticks (215 of the 257 sampled). Among all one-step and two-step nested clades, only four were composed of ticks from a single host race (1-2, 1-4, 1-8 and 1-11). We tested for an association between host type and haplotypes/clades in the 12 other clades; a significant X^2 -test was observed in only three (Table 4). These significant tests reflect that most haplotypes in the clade, other than the interior haplotype, are associated with a single host race (Figure 3). The test performed over the entire cladogram yielded a marginally non-significant association between host of origin and haplotype distribution (P -value = 0.0764; Table 4).

The cladogram showed stronger support for an association between the genetic variation of *I. uriae* and its geographical location (Table 5). Three of the 11 X^2 -tests for geographical association and overall test across the entire cladogram were significant (Figure 4, Table 5). The inference of historical events that may have shaped the haplotype distribution suggested either a contiguous range expansion of *Ixodes uriae* within the sampled area (clade 1-7 and entire cladogram, Table 5), or restricted gene flow with isolation by distance (clades 1-9 and 2-3, containing 1-9). In line with these observations, the nested clade 2-3 contained two haplotypes unevenly distributed among FI, GR and HO (H7 and H8 were only found in FI and GR, respectively, and H9 and H10 were mostly found in HO). Moreover, this isolation by distance hypothesis mainly concerned kittiwake and guillemot ticks (each of these host races representing 41% of the 22 ticks of the nested clade 2-3).

Discussion

In the present study, we examined population and phylogeographic structure of a common seabird ectoparasite, the tick *Ixodes uriae*, in order to better understand the history of host-associated divergence in this system. To do this, we compared two types of genetic markers, microsatellite markers that reflect more ecological time scales and a conserved mitochondrial gene that should reflect more ancient divergence events. As previously inferred in other population genetic studies (McCoy *et al.* 2001, 2005b), we found significant divergence among tick populations sampled from different sympatric seabird species, indicating that the evolution of host-associated races is a general pattern in this ectoparasite. Likewise, analyses of the COIII gene support the hypothesis that these races have evolved relatively recently and independently in different isolated geographic locations.

Population structure of Ixodes uriae

In this study, divergence among tick populations sampled in heterospecific seabird colonies (i.e., where several species breed sympatrically) was examined in four Icelandic colonies and was compared with previous results found in two other colonies (FI, HO). Except for ticks sampled from razorbills (see below), tests showed significant differentiation among tick populations sampled from the different local host species. Indeed, the exploited host explained a large part of the genetic variation in these populations, as indicated by relatively high probabilities to assign ticks to the host of origin compared to the population of origin, particularly for ticks from guillemots and puffins. Razorbill ticks did not show any evidence of host specialisation in the two colonies examined in this study. This result is not surprising given the reproductive behaviour of this species; compared to the other seabird species sampled, razorbills are relatively isolated breeders with nests spread throughout the colony and inter-mixed among other, more densely, breeding birds. This mixing may select against the evolution of host specificity for this particular host. These results, along with patterns found in previous studies (McCoy *et al.* 2005b) support the general notion that the constraints imposed by host life history traits are an essential component driving the evolution of parasite specialisation (e.g., (Tripet, Richner, 1997)). In the present study, the fact that many seabird species breed in dense and temporally predictable patches likely favours the recurrent evolution of host specialisation in this system.

Within each host race of ticks, patterns of geographical population structure were variable. For example, puffin ticks from different colonies grouped tightly together in the principal component analysis and showed no significant differentiation among colonies (results not shown) suggesting significant gene flow among these populations. Population structure was intermediate in kittiwake ticks. In guillemot ticks, two population groups could be identified; one that included the tick population from northern Norway (Hornøya) and two Icelandic populations (Grimsey and Skrudur) and the other that grouped the western Icelandic population (Latrabjarg) with the UK population (Fair Isle). Previous results showed that the population of guillemot ticks from Hornøya was genetically distant from other southern European populations. The fact that two Icelandic populations group with this population suggests the presence of at least two groups of guillemots in Iceland that function independently despite geographic proximity; birds from the north and east of Iceland could interact more strongly with birds from the Barents Sea whereas those from the west coast of Iceland could interact with populations to the south. This is in line with previous records showing that young guillemots of Western Europe have different wintering areas depending on their origin (e.g. North Sea for the young guillemot from Scotland, the Bay of Biscay for guillemots from the area of Celtic Sea, Harris, Swann (2002)), although little genetic structure exists in their population (Riffaut *et al.*, 2005). Associations among populations in the wintering areas may reflect the general interaction among birds of these different colonies and thus the probability of dispersing ticks among sites. As *I. uriae* depends on bird movement within the breeding season for its dispersal (McCoy *et al.*, 2005b), and particularly on movements of young or failed breeders (Coulson, Nève de Mévergnies, 1992), interspecific differences in the frequency and spatial scale of dispersal will have significant consequences for the coevolutionary dynamics of this system (e.g., (Gandon, Van Zandt, 1998), and for the epidemiology of tick-borne diseases (McCoy *et al.*, 2003).

Host specialisation and phylogeography

Despite strong patterns of geographic and host-associated structure in the microsatellites of *I. uriae*, the distribution of COIII haplotypes was found to be relatively homogenous among host types, and most haplotypes, including the most common, were shared among host groups. The X^2 -tests for associations between host exploitation and haplotype distribution within each nested clade yielded a marginally non-significant pattern overall (P -value = 0.0764). The historical relationships among the host races can therefore not be clearly deduced from the cladogram. The

most abundant haplotypes (e.g. H1, H2) were shared by all tick host races. Nevertheless, results found at microsatellite loci and the marginally non-significant pattern found for the COIII gene suggest that the signature of host-associated divergence is starting to appear at more conserved markers. Based on this hypothesis, we would predict that host-associated structure should be more obvious at faster evolving markers in the mitochondrial genome.

As evoked above, host specialisation and geographic isolation interact to produce patterns of population structure in *I. uriae*. The haplotype network found for the COIII gene fragment considered was significantly geographically structured (P -value = 0.0104). The NCA inferences suggest that these patterns reflect contiguous range expansion in certain clades, an inference consistent with the star-like topology of the cladogram. This result is also in line with the strongly significant P -values of Tajima's and Fu's tests of neutrality (P -value < 0.01, not shown) which can be interpreted in this sense (Fu, 1997; Tajima, 1989). In nested clade 2.3 (representing only 8.5% of the sampled individuals), the haplotype distribution supports the hypothesis of a clade range expansion with isolation by distance. Inferences based on nested clade analyses have been strongly criticised in the literature, particularly because the most abundant haplotypes can be interpreted as being either ancestral or derived and may thus lead to false-positive inferences (Petit *et al.*, 1998; Petit, Grivet, 2002). However, the existence of isolation by distance has also been found in microsatellite-based genetic studies in kittiwake and guillemot ticks (these ticks represent the main part of clade 2.3) (McCoy *et al.*, 2003; Riffaut *et al.*, 2005), arguing for the validity of the inferences. Thus, patterns of host movements may not only induce differences in the contemporary genetic structure of ticks, but may also reflect the spread of ticks at a more historical timescale.

An experimental study has demonstrated the existence of local adaptation in *I. uriae* at the within-colony scale in kittiwakes (McCoy *et al.*, 2002). Adaptive divergence at a fine spatial scale therefore seems to be a general aspect in the evolution of the *I. uriae*/host interaction, whether it is associated with different host species or distinct subgroups of a particular host species. In line with theoretical work (Carroll *et al.*, 2007; Garant *et al.*, 2007), this supports the notion that local ecological interactions, and particularly antagonistic interactions, may change very quickly and can differ strongly in relation to local conditions and the extent of among population gene flow. Based on our results, we propose that specialization in *I. uriae* may evolve locally after only a few generations and that this has occurred repeatedly across its distribution. Not only do these results have important consequences for the population dynamics of seabirds, but they also may have significant implications for the epidemiology of pathogens vectored by *I. uriae*, including *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the bacterial complex responsible for human Lyme disease. Indeed, both

vector diversity and rapid genetic change can strongly influence the dynamics of the host/vector/pathogen interaction (Fussman 2007; Power, Flecker, 2008). The relatively rapid and repeated evolution of host-associated divergence found in *I. uriae* therefore highlights the need for more explicit tests of the host-associated structure in other tick species, particularly in systems of significant medical and economic importance.

Acknowledgements

We thank A. Pedersen, R.T. Barrett, T. Tveraa, J. Gray and the staff of the Fair Isle Bird Observatory for assistance with sampling. We also thank J. Michaux, N. Galtier, B. Godelle, E. Gomez-Diaz, M. Dietrich and members of the “Ticks and tick-borne diseases” working group of the Réseau Ecologie des Interactions Durables (REID) for useful discussions. This study was financed by grants from the Bureau des Ressources Génétiques, the Agence National de la Recherche (ANR-06-JCJC-0095-01) and the Institut Polaire Français – Paul Emile Victor (Programme °333). Florent Kempf is supported by the French Ministry for National Education and Research.

References

- Avice JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* **7**, 371-379.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**, 729-744.
- Carroll SP, Hendry AP, Reznick DN, Fox CW (2007) Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology* **21**, 387-393.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1659.

- Cornuet J-M, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**, 1989-2000.
- Coulson JC, Nève de Mévergnies G (1992) Where do young kittiwakes *Rissa tridactyla* breed, philopatry or dispersal? *Ardea* **80**, 187-197.
- De Meeûs T, Michalakakis Y, Renaud F (1998) Santa Rosalia revisited: or why are there so many kinds of parasites in 'The Garden of Earthly Delights'? *Parasitology Today* **14**, 10-13.
- Drès M, Mallet J (2002) Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **357**, 471-492.
- Feder JL, Xie XF, Rull J, *et al.* (2005) Mayr, Dobzhansky, and Bush and the complexities of sympatric speciation in Rhagoletis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6573-6580.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.
- Fussmann GF, Loreau M, Abrams PA (2007) Eco-evolutionary dynamics of communities and ecosystems. *Functional Ecology* **21**, 465-477.
- Gandon S, Van Zandt PA (1998) Local adaptation and host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **13**, 214-216.
- Garant D, Forde SE, Hendry AP (2007) The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. *Functional Ecology* **21**, 434-443.
- Gern L, Humair PF (2002) Ecology of *B. burgdorferi* in Europe. In: *Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control* (eds. Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- Gingerich PD (2001) Rates of evolution on the time scale of the evolutionary process. *Genetica* **112-113**, 127-144.
- Goudet J (1999) PCA-GEN for Windows. Institute of Ecology, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland.

- Goudet J (2002) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices . Ver. 2.9.3.2.
- Guiguen C (1988) *Anthropozoonoses et oiseaux marins: contribution à l'étude des ectoparasites hématophages des espèces nicheuses sur les côtes françaises continentales et insulaires*. Thèse de Doctorat, Faculté de Médecine de Marseille.
- Harris MP, Swann B (2002) Common guillemot. In: *The migration atlas: movements of birds of Britain an Ireland* (eds. Wernham CV, Toms MP, Marchant JH, *et al.*), pp. 397-400. T. & A.D. Poyser, London.
- Howes BJ, Lindsay B, Loughheed SC (2006) Range-wide phylogeography of a temperate lizard, the five-lined skink (*Eumeces fasciatus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**, 183-194.
- Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL (1992) A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology Evolution* **9**, 138-151.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Evolution and Ecology* **11**, 424-429.
- Kain DE, Sperling FAH, Daly HV, Lane RS (1999) Mitochondrial DNA sequence variation in *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity* **83**, 378-386.
- Kirkpatrick M, Ravigné V (2002) Speciation by natural and sexual selection: Models and experiments. *American Naturalist* **159**, S22-S35.
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Oliver Jr. JH (1996) Evolution of ticks. *Annual Reviews in Entomology* **41**, 141-161.
- Magalhaes S, Forbes MR, Skoracka A, *et al.* (2007) Host race formation in the Acari. *Experimental and Applied Acarology* **42**, 225-238.
- McCoy KD (2003) Sympatric speciation in parasites - what is sympatry? *Trends in Parasitology* **19**, 400-404.
- McCoy KD (2008) The Population Genetic Structure of Vectors and our Understanding of Disease Epidemiology. *Parasite* **15**, 444-448.
- McCoy KD, Boulinier T, Schjørring S, Michalakis Y (2002) Local adaptation of the ectoparasite *Ixodes uriae* to its seabird host. *Evolutionary Ecology Research* **4**, 441-456.

- McCoy KD, Chapuis E, Tirard C, *et al.* (2005a) Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 2389-2395.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, Michalakis Y (2001) Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 395-405.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, Michalakis Y (2003) Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution* **57**, 288-296.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C (2005b) Comparative host-parasite population structures: disentangling prospecting and dispersal in the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*. *Molecular Ecology* **14**, 2825-2838.
- McCoy KD, Tirard C (2000) Isolation and characterisation of microsatellites in the seabird ectoparasite *Ixodes uriae*. *Molecular Ecology* **9**, 2213-2214.
- McDonald JH, Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature* **351**, 652-654.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press, New York.
- Orr MR, Smith TB (1998) Ecology and speciation. *Trends In Ecology & Evolution* **13**, 502-506.
- Parola P, Raoult D (2001) Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases* **32**, 897-928.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844-855.
- Petit RJ, Grivet D (2002) Optimal randomization strategies when testing the existence of a phylogeographic structure. *Genetics* **161**, 469-471.
- Pfenninger M, Posada D (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* **56**, 1776-1788.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, *et al.* (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**, 536-539.

- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2006) Nested clade analysis statistics. *Molecular Ecology Notes* **6**, 590-593.
- Power AG, Flecker AS (2008) The Role of Vector Diversity on Disease Dynamics. In: *Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems* (eds. Ostfeld RS, Keesing F, Evimer VT), pp. 30-47. Princeton University Press, Princeton.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP(version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Riffaut L, McCoy KD, Tirard C, Friesen VL, Boulinier T (2005) Population genetics of the common guillemot *Uria aalge* in the North Atlantic: assessing the geographic impact of oil spills. *Marine Ecology Progress Series* **291**, 263-273.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.
- Schwarz D, Matta BM, Shakir-Botteri NL, McPherson BA (2005) Host shift to an invasive plant triggers rapid animal hybrid speciation. *Nature* **436**, 546-549.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* **7**, 381-397.
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* **13**, 789-809.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**, 619-633.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Thompson JN (1998) Rapid evolution as an ecological process. *Trends in Ecology and Evolution* **13**, 329-332.

- Tripet F, Richner H (1997) The coevolutionary potential of a 'generalist' parasite, the hen flea *Ceratophyllus gallinae*. *Parasitology* **115**, 419-427.
- Via S (2001) Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 381-390.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**, 395-420.
- Yoshida T, Jones LE, Ellner SP, Fussmann GF, Hairston NG, Jr. (2003) Rapid evolution drives ecological dynamics in a predator-prey system. *Nature* **424**, 303-306.

Table 1. Sampling details and genetic variation in the studied *Ixodes uriae* populations. Host species are coded as CG (common guillemot *Uria aalge*), KT (black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*), PF (Atlantic Puffin *Fratercula artica*) and RZ (Razorbill, *Alca torda*). Nucleotide diversity (π) and gene diversity (\pm standard errors) are based on Nei's estimators (Nei, 1987).

Colony	Code	Latitude/ Longitude	Host	No. ticks (COIII)	π (COIII)	No. ticks (microsat.)	Gene diversity
Hrolfskrettur, Iceland	HR	65°29'N/ 24°32'W	KT	19	0.00361	20	0.5922 (0.1015)
			PF	23	0.00406	30	0.5406 (0.1343)
Latrabjarg, Iceland	LT	65°28'N/ 24°28'W	CG	16	0.00596	11	0.5417 (0.1021)
			RZ	12	0.00452	14	0.5947 (0.1084)
Skrudur, Iceland	SK	64° 54' N/ 13° 37'W	CG	—	—	29	0.6435 (0.0796)
			KT	—	—	27	0.6884 (0.0623)
			PF	—	—	30	0.5236 (0.1254)
Grimsey, Iceland	GR	66°33'N/ 18°00'W	CG	22	0.00627	30	0.7331 (0.0410)
			KT	20	0.00539	30	0.7310 (0.0421)
			PF	19	0.00306	35	0.5479 (0.1282)
			RZ	16	0.0054	15	0.6335 (0.0712)
Hornøya, Norway	HO	70°22'N/ 31°10'E	CG	18	0.00566	24	0.6082 (0.0730)
			KT	14	0.00463	29	0.5873 (0.0906)
			PF	20	0.00494	31	0.5895 (0.1155)
			RZ	2	0.00648	—	—
Fair Isle, United Kingdom	FI	53°33'N/ 1°36'W	CG	19	0.00531	27	0.5173 (0.1195)
			KT	19	0.00421	42	0.5428 (0.0974)
			PF	18	0.00383	38	0.5213 (0.1360)

Table 2. Pairwise differentiation between host-associated tick groups as estimated by Weir and Cockerham's (1984) estimator of F_{st} (θ). Significant P-values after Bonferroni correction are in bold. Host abbreviations as outlined in Table 1.

Colony	Host	θ	<i>P</i> -value
Hrolfskrettur	KT-PF	0.0299	< 0.0004
Latrabjarg	CG-RZ	-0.0002	0.72316
Grimsey	CG-KT	0.0372	< 0.0004
	CG-PF	0.1644	< 0.0004
	CG-RZ	0.0660	0.00110
	KT-PF	0.1025	< 0.0004
	KT-RZ	0.0209	0.03566
	PF-RZ	0.1003	0.00110
Skrudur	CG-KT	0.1305	< 0.0004
	CG-PF	0.2934	< 0.0004
	KT-PF	0.0801	< 0.0004
Fair Isle	CG-KT	0.0593	0.00147
	CG-PF	0.1630	< 0.0004
	KT-PF	0.0735	< 0.0004
Hornøya	CG-KT	0.1603	< 0.0004
	CG-PF	0.2243	< 0.0004
	KT-PF	0.0600	< 0.0004

Table 3. Average percentage of tick assignments (\pm standard error) to host race including (a) and excluding (b) ticks sampled from razorbills. Host species abbreviations as outlined in Table 1.

Razorbill ticks	Tick race	Assigned to				
		CG	KT	PF	RZ	Population
a) Included	CG	77.7 (12.2)	4.0 (1.9)	2.23 (0.9)	16.1 (10.8)	49.0 (5.6)
	KT	37.5 (9.1)	35.9 (5.5)	11.3 (3.9)	15.3 (2.8)	29.2 (5.9)
	PF	4.3 (1.2)	4.3 (1.9)	86.1 (1.5)	5.3 (0.9)	26.2 (8.0)
	RZ	59.1 (12.4)	6.7 (6.7)	13.4 (13.4)	21.0 (7.7)	24.5 (11.5)
b) Excluded	CG	93.1 (2.1)	4.6 (1.9)	2.2 (0.9)		
	KT	40.4 (9.2)	47.8 (6.5)	11.8 (6.7)		
	PF	4.4 (1.2)	6.2 (1.6)	89.5 (1.9)		

Table 4. χ^2 -tests for association between haplotypes and host of origin within each clade. Clades and the distribution of host types are found in Figure 5. Significant P -values appear in bold.

Clade	χ^2 -statistic	P -value
1-1	62.86	0.019
1-3	2.40	1.000
1-5	8.53	0.247
1-6	10.36	0.534
1-7	24.08	0.773
1-9	0.84	1.000
1-10	1.41	1.000
1-12	46.91	<0.001
2-1	12.78	0.376
2-2	11.64	0.045
2-3	6.37	0.099
2-4	2.09	1.000
Cladogram	15.43	0.076

Table 5. Results of the NCA analysis following Templeton's inference key (Templeton, 2004). Significant *P*-values appear in bold. Biological inferences and chain inferences are provided for clades showing significant X^2 -tests for the association between haplotypes and geographic location.

Clades	X^2 -statistic	<i>P</i> -value	Chain of	Inference
1-1	65.95	0.254	NS	
1-5	6.67	0.462	NS	
1-6	6.87	0.671	NS	
1-7	52.29	0.009	2-11-12	Contiguous Range expansion
1-9	18.85	0.008	2-3-4	Restricted Gene Flow with Isolation by distance
1-10	0.32	1.000	NS	
1-12	10.18	0.804	NS	
2-1	37.46	0.001	2-3-5-6-7-8	Too few clades
2-2	7.74	0.481	NS	
2-3	9.18	0.028	2-3-4	Restricted Gene Flow with Isolation by distance
2-4	1.23	1.000	NS	
Cladogram	21.70	0.037	2-11-17-13	Contiguous Range expansion

Figure 1. Sampling sites of the ticks used for the mitochondrial DNA and microsatellite analyses.
See Table 1 for exact locations and host sampled.

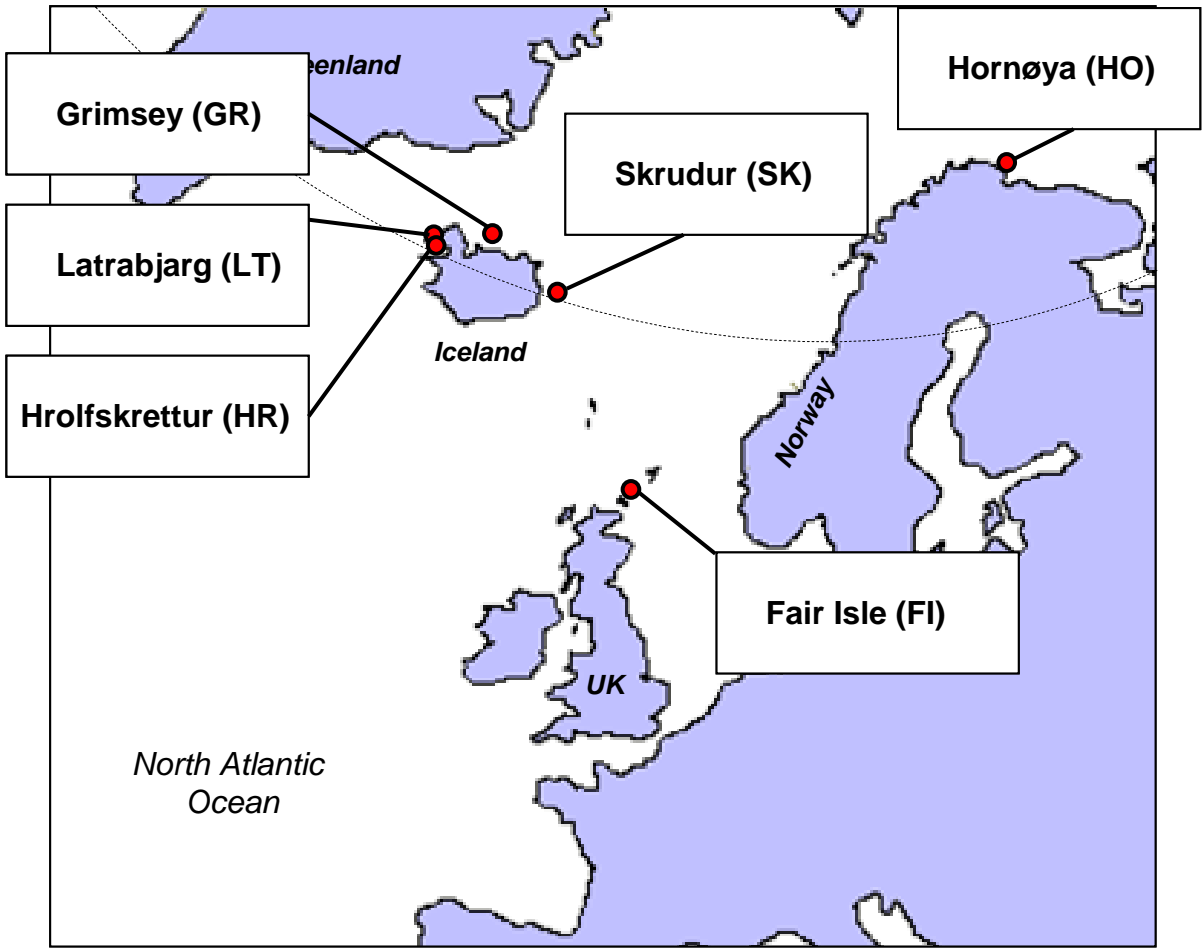


Figure 2. Principal component analysis of *I. uriae* populations revealed two significant axes that explained 59% (PCA1) and 22% (PCA2) of the total inertia of the microsatellite data. Different colours refer to the host species of origin (green = guillemot; red = puffin; blue = kittiwake; black = razorbill) and symbols represent the different sampled colonies (circle=Grimsey; square=Hrolfskrettur; square+cross=Latrabjarg; downward triangle=Skrudur; upward triangle+cross = Fair Isle; diamond = Hornøya).

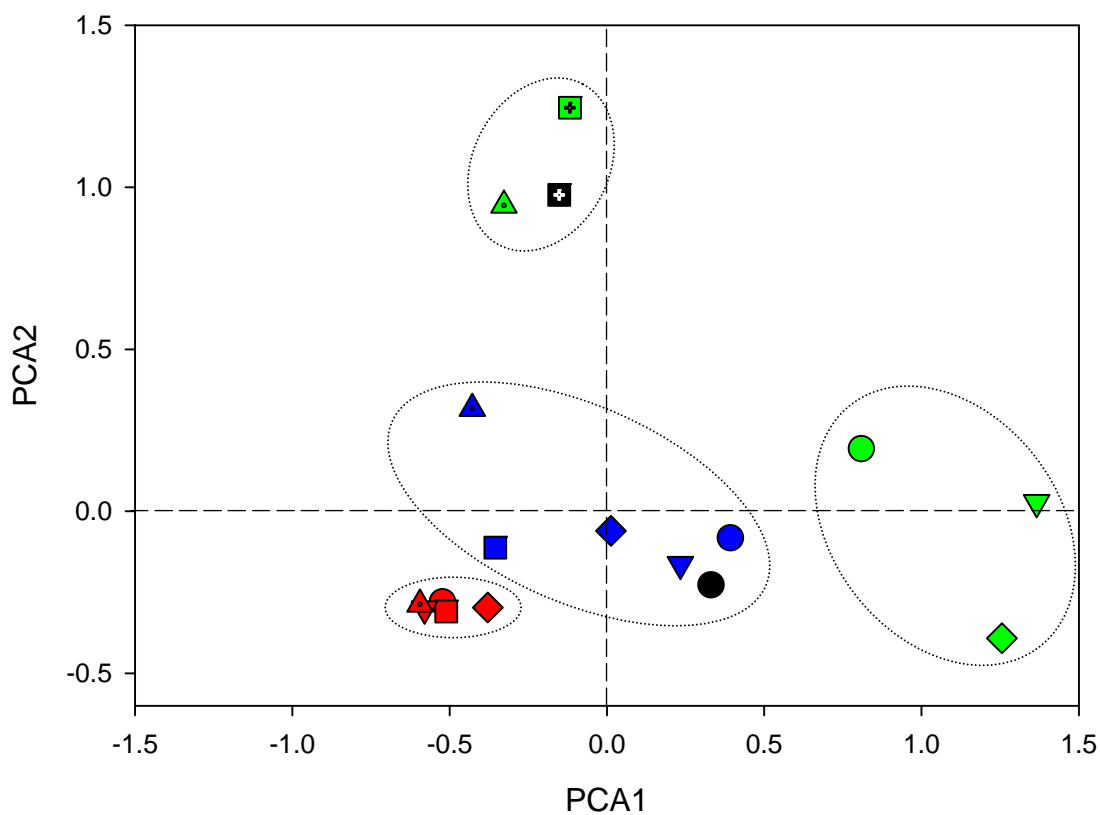


Figure 3. Nested cladogram of COIII haplotypes of *I. uriae*. Circle size is representative of overall haplotype frequency. The proportions of ticks sampled from each host species are represented in different colours. Dotted lines correspond to the genetic relations disregarded according to Pfenninger & Posada's criteria (Pfenninger, Posada 2002).

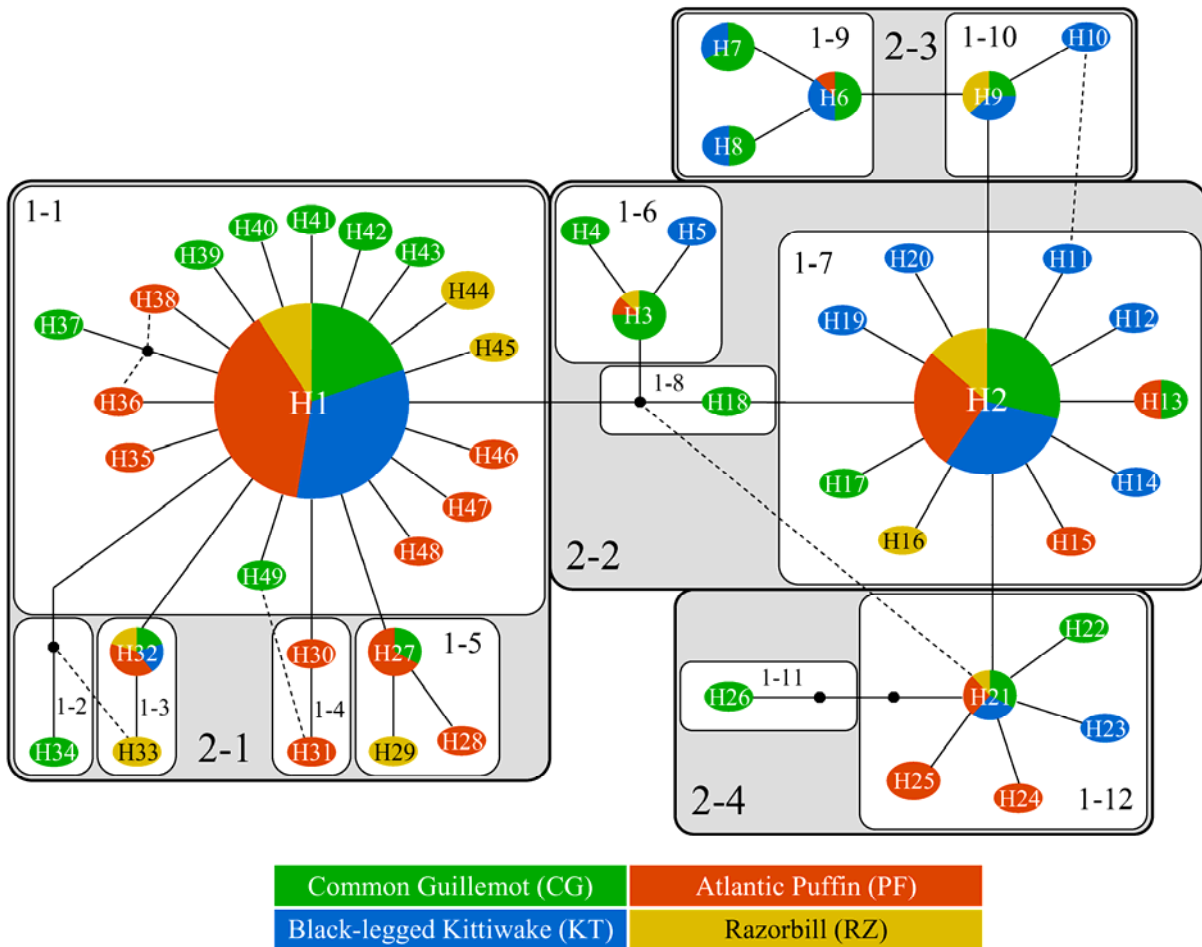
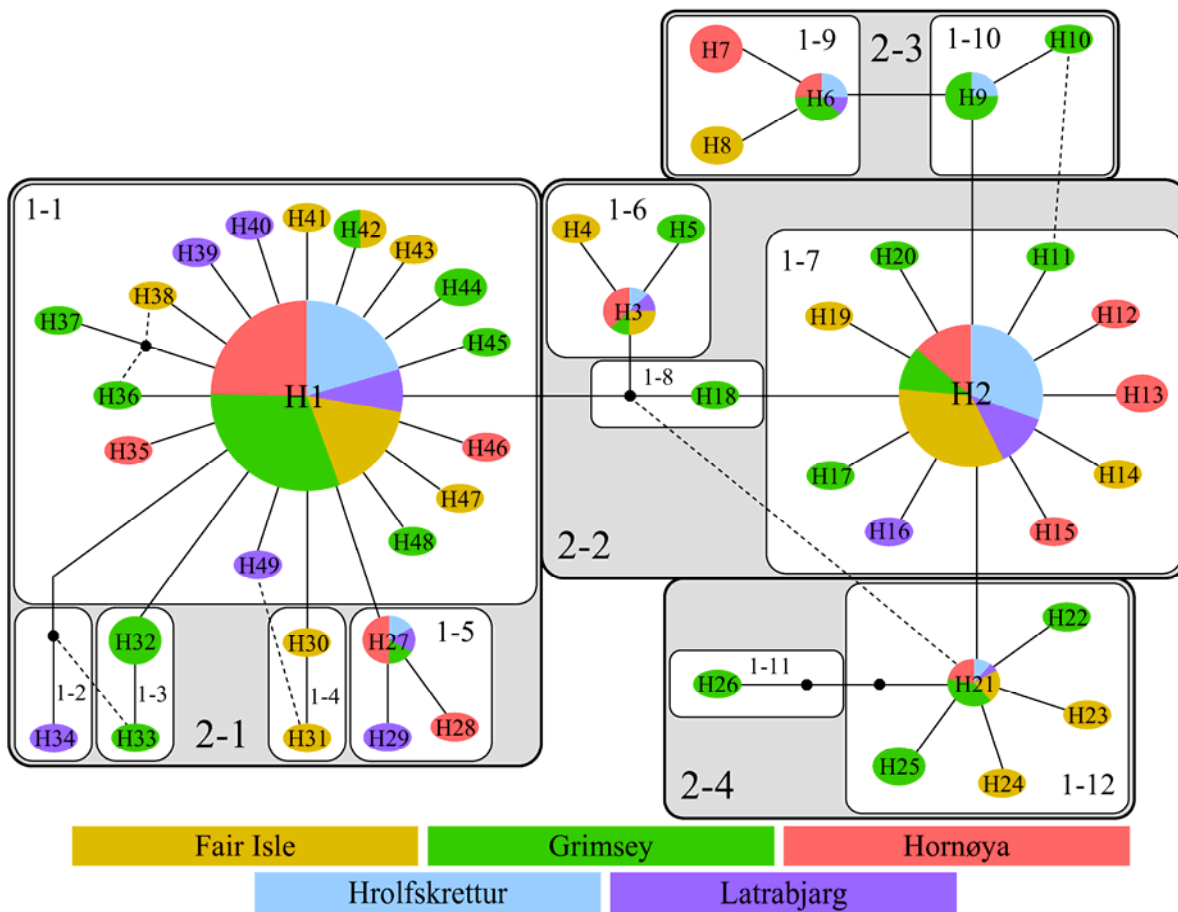


Figure 4. Nested cladogram of COIII haplotypes of *I. uriae*. Circle size is representative of overall haplotype frequency. The proportion of ticks sampled in the five different geographic locations are represented with different colours. Dotted lines correspond to the genetic relations disregarded according to Pfenninger & Posada's criteria (Pfenninger, Posada 2002).



Bilan

La raciation en différentes entités adaptées à différents hôtes semble donc représenter un phénomène rapide et récurrent chez *I. uriae*. Peut-on s'attendre aux mêmes tendances chez le vecteur continental de la borréliose de Lyme *I. ricinus*? Nous avons donc recherché à mettre en évidence la possible existence de races d'hôtes chez cette tique par le truchement de trois approches de complexité de mise en œuvre différente. (1) Une méthode totalement indirecte d'analyse des stratégies d'appariement en populations naturelles de cette tique, attendu assorti en cas d'existence de races d'hôtes. (2) Une méthode moins indirecte de recherche dans un jeu de données génétique important déjà publié de l'existence de sous-groupes différenciés par une analyse bayésienne de mixture de populations. (3) La troisième approche, beaucoup plus directe mais très lourde pour cette espèce de tique, consistait quant à elle à étudier la variation de l'information génétique entre tiques récoltées sur différents types d'espèces hôtes différents après capture de ces derniers.

5. Ixodes ricinus :
Appariement assorti, dispersion, sous-structure et
spécialisation par type d'hôtes

5.1. *Assortative Pairing in Ixodes ricinus L. (Acari:Ixodidae), the European Vector of Lyme Borreliosis* (J. Med. Entomol., sous presse)

Assortative Pairing in *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae), the European Vector of Lyme Borreliosis

FLORENT KEMPF,^{1,2} THIERRY DE MEEÛS,¹ CÉLINE ARNATHAU,¹
BRIGITTE DEGEILH,³ AND KAREN D. MCCOY¹

J. Med. Entomol. 45(6): 000–000 (2008)

AQ: 1

ABSTRACT In sexual organisms, the way in which gametes associate can greatly influence the maintenance of genetic variation, the structure of this variation in space, and ultimately organismal evolution. Based on patterns of genetic structure previously found, we explicitly tested whether adults of the sheep tick *Ixodes ricinus* pair according to their genetic relatedness. We sampled tick pairs from the vegetation in four natural populations and genotyped individual ticks at seven microsatellite loci. Based on this data, we observed highly significant assortative mating in two of the four locations, a pattern that could not be accounted for by a spatial autocorrelation in the distribution of related ticks. One explanation for these observations may be the existence of local host associations that develop independently in different populations. Assortative mating in *I. ricinus* will have clear consequences for its population dynamics and, through processes of adaptation and transmission, may significantly alter the epidemiological patterns of the pathogens it carries, including the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* s.l. Future tests will now be required to examine the mechanisms leading to this pattern and its epidemiological consequences.

KEY WORDS assortative mating, genetic structure, host-associated divergence, vector-borne disease

Ticks are hematophagous ectoparasites and are second only to mosquitoes as major vectors of human and livestock disease (Troughton and Levin 2007). Despite their importance, we know relatively little about how their populations function under natural conditions or how different dynamics may alter pathogen transmission cycles. One tick of particular importance in Europe is *Ixodes ricinus*, a tick that transmits a variety of pathogenic agents, including Lyme disease bacteria *Borrelia burgdorferi* s.l.

In an innovating paper on *I. ricinus* population genetics, De Meeûs et al. (2002) found large heterozygote deficits that could not be entirely explained by technical biases in the data (De Meeûs et al. 2002, 2004). One hypothesis to explain these biases is the mode of pair formation. In particular, if these ticks show assortative mating for some genetically determined trait (i.e., a tendency to mate with similar individuals), within-population structure could occur, resulting in a dramatic decrease in population heterozygosity (i.e., inbred mating system). Such a mating pattern will have important consequences for the population dynamics of both the tick and the pathogens it carries because it will influence the maintenance of genetic variation, the structure of this variation in space, and

ultimately organismal evolution (Kirkpatrick and Ravigné 2002, Bolnick and Fitzpatrick 2007).

In this paper, we test for a departure from pangamy (i.e., random pairing of sexual partners) in *I. ricinus* by examining mating patterns in four natural *I. ricinus* populations. In this species, paired adult individuals can be easily collected during their questing phase when they cluster on the tips of vegetation to ambush their hosts. If assortative mating occurs, we expect paired ticks to be more closely related than two randomly sampled individuals from the population. To rule out the possible effect of a spatial autocorrelation in genetic relatedness, we also tested if ticks aggregated locally according to their genotype (i.e., if tick broods remain associated after dispersal).

Materials and Methods

Sampling. During spring of 2006, 93 adult ticks were collected from the vegetation in four sites in northern France (Fig. 1), including 29 pairs and eight groups. In all but one case, pairs included males in direct contact with females, suggesting guarding behavior by the males (Kiszewski et al. 2001). In the *Ixodes* genus, mating ticks may remain in copula for several days. This mating frequently occurs before the bloodmeal, on the ground or on the vegetation, but may also take place on the host (Kiszewski et al. 2001). Females can mate with multiple, successive males. All collected ticks were stored in 90% ethanol until DNA extractions.

F1

¹ Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses, UMR CNRS-IRD 2724, Centre IRD, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

² Corresponding author, e-mail: Florent.Kempf@mpl.ird.fr.

³ Laboratoire de Parasitologie et Zoologie Appliquée, Faculté de Médecine, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France.

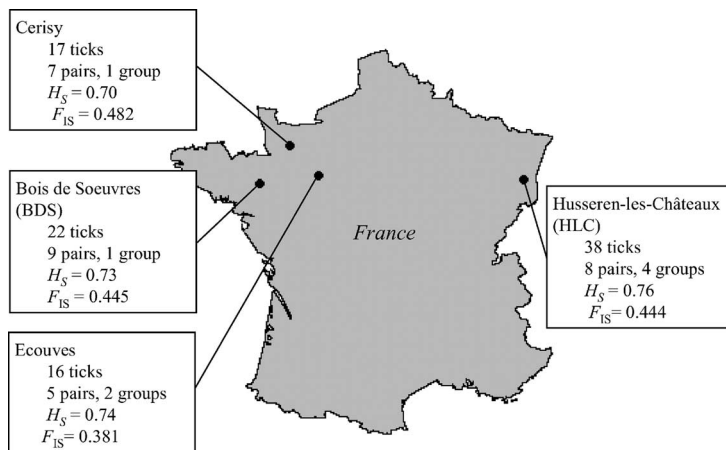


Fig. 1. Sampling locations of *I. ricinus*. The sample sizes (ticks, tick pairs, tick groups) are indicated for each location along with the mean unbiased expected genetic diversity, H_s (Nei 1987; F_{IS} of Weir and Cockerham's (1984). In all cases, the F_{IS} was significant ($P < 0.001$).

Genotyping. Conserved ticks were washed three times in distilled water to eliminate ethanol and were cut in half. One half was ground with a mixer mill 301 (Retsch, Germany), and DNA was extracted using a Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA). Ticks were genotyped at seven microsatellite loci: *IRN15*, *IRN37* (Roed et al. 2006), *IsaC4* (Fagerberg et al. 2001), *IR25*, *IR27*, *IR39*, and *IR32* (Delaye et al. 1998), following the polymerase chain reaction (PCR) protocols proposed by the authors. Genotypes were visualized using an automated sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser; Applied Biosystems, Perkin-Elmer).

Genetic Analyses. We tested for the independence of the markers using the G-based test for linkage disequilibrium implemented in FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2001) with 15,000 randomizations of single locus genotypes among individuals within sites using all collected ticks (i.e., groups and pairs). Multiple testing was corrected by the Bonferroni method (Holm 1979), and the number of significant tests was compared with the expected proportion under the null hypothesis (0.05) with a unilateral binomial test (H_1 : the number of significant tests is $>5\%$). Genetic variability was assessed using Nei's unbiased estimator of genetic diversity (H_s , Nei 1987). We investigated departure from Hardy-Weinberg equilibrium by estimating Wright's F_{IS} (Wright 1965), using all collected ticks and Weir and Cockerham's (Weir and Cockerham 1984) estimator. The values of estimated F_{IS} were compared with the distribution obtained by randomizing alleles among individuals in each sample (15,000 permutations) (Goudet 2001).

We tested for nonrandom pairing in males and females by regressing the genetic relatedness in all potential male-female pairs against the mating status. Genetic relatedness was computed using Wang's estimator because of its robustness to small sample sizes (Wang 2002). The mating status of two ticks was coded as "1" when both ticks belonged to same mating pair and "0" when they were from different pairs. Under the hypothesis of as-

sortative mating, we expected that mating status would significantly explain genetic relatedness, suggesting that ticks prefer kin as mates. We performed the computations with the freeware MER v. 3.0 (<http://www.zoo.cam.ac.uk/ioz/software.htm#MER>). This was tested by comparing the observed absolute regression coefficient to its chance distribution, calculated by randomizing the mating status 15,000 times. The analyses were carried out using the "Mantelize it" procedure of the program FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 2001). To assess the power of our test to detect departure from pangamy, we performed the same analyses on a rearranged dataset that included the same ticks as the original data, but where the mating status was altered so that the most closely related individuals formed mating pairs.

We used the tick groups data to ensure that mating patterns were not simply a reflection of a spatial autocorrelation in genetic relatedness (i.e., individuals found together on vegetation are from the same brood). We compared the group membership and the genetic relatedness between all potential pairs of individuals (i.e., regardless of their sex) found as groups in each site. If both ticks of a given pair were found in the same group, their membership was coded as "1" and otherwise as "0." Under the hypothesis of a spatially autocorrelated relatedness, we expected that group membership would significantly explain genetic relatedness. As above, this was tested using FSTAT v. 2.9.3.2, and we performed a parallel analysis on rearranged data, containing the same number of groups, but where these groups were composed of the most closely related individuals within the sampled population.

Results and Discussion

All seven markers were polymorphic, and genetic diversities were high in each sample (>0.7 ; Fig. 1). Only one locus pair (*IRN15*, *IRN37*) showed significant linkage disequilibrium ($P = 0.03571$). However, this was no longer significant after sequential Bonferroni correction, and 1 significant test of 14 loci pairs is not significantly

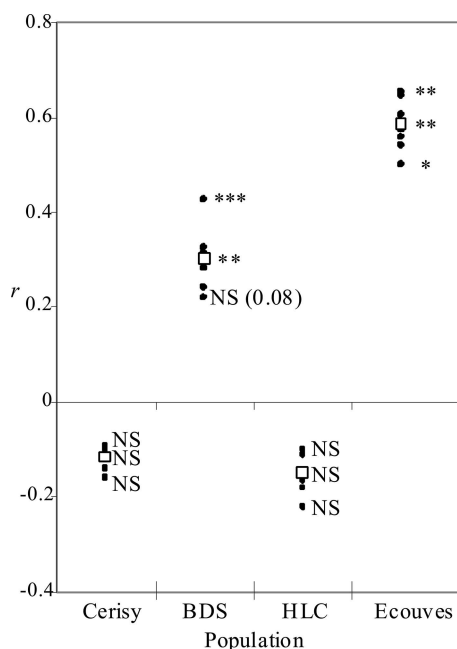


Fig. 2. Correlation coefficients (r) between relatedness and mating status among tick pairs. We distinguish correlation coefficients obtained after jackknifing over the seven loci (dots) and considering all loci (squares) in the four sampling locations. We also report the P values of the minimum and maximum correlations observed in the jackknifed datasets and for the complete dataset. We used the following annotations: NS, $P > 0.05$; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$. The correlations and P values found for the rearranged datasets that maximized the relatedness between pairs within each population were, respectively, $r = 0.74$ (Cerisy), 0.69 (BDS), 0.67 (HLC), and 0.78 (Ecouves). The r 's were all highly significant ($P < 0.001$).

different from that expected under the null hypothesis ($P = 0.5123$).

Strong and significant heterozygote deficiencies were observed within all samples and at all loci (average $F_{IS} = 0.452$, $P = 0.00007$; Fig. 1). In a previous study, De Meeüs et al. (2002) found high heterozygote deficiencies at each locus examined that were explained in part by the presence of technical biases, i.e., null alleles or a process of short allele dominance (De Meeüs et al. 2002, 2004, Roed et al. 2006). Such technical biases are likely to increase the variance of parameter estimates. However, despite this variance, we observed a highly significant positive correlation between the mating status and the relatedness of pairs in two of the four populations studied (BDS and Ecouves; Fig. 2). In Ecouves, this value was close to the highest possible value (Fig. 2). For Cerisy and HLC, correlations were negative and nonsignificant ($P = 0.4069$ and 0.2317 , respectively). The lack of significance in these two populations was not caused by the power of the test; in the rearranged datasets, we were able to detect highly significant departures from pan-gamy in all populations (Fig. 2). Similarly, we confirmed by jackknifing that these results did not rely on any one locus (Fig. 2), and we obtained similar results

when the same analysis was performed with another relatedness measure, the shared allelic distance (D_{sa} , Bowcock et al. 1994) (results not shown). Finally, there was no evidence of spatial autocorrelation in relatedness that may have explained results. Indeed, group membership could not explain the genetic relatedness among tick pairs (mean correlation over all populations: $r = -0.254$; combined P value using Fisher method [Manly 1985] over all populations: $P = 0.32$), despite the fact that we were able to detect highly significant relationships in the rearranged dataset (mean $r = 0.790$, combined $P = 7 \times 10^{-10}$). In a different approach, we obtained similar results using hierarchical F -statistics (Goudet 2005): the $F_{Group/Site}$ (i.e., differentiation between groups within sites) was not significant ($P = 0.2262$, 10,000 permutations). The presence of tick groups is therefore likely associated with constraints on questing individuals that cluster at opportune sites without regard to sex or genotype (Healy and Bourke 2008, Medlock et al. 2008), whereas observed pairs may correspond to preprandial mating with assortment by relatedness.

Based on these results, it seems that the differences in mating patterns observed among populations must be caused by biological differences among these populations. If we hypothesize, for example, that within-population structure in *I. ricinus* is partially caused by local host-associated divergences and that observed patterns of assortative mating correspond to mating preferences for ticks of the same race, the differences among populations may be caused by a variable presence of different races. Indeed, many observations potentially support the existence of cryptic host-related subgroups in tick species and the dynamic nature of such divergences (McCoy et al. 2005, Magalhaes et al. 2007). There were noticeable differences in the distribution of the sampled ticks in the different populations considered here. Ticks of BDS and Ecouves were dispersed across an area of ~ 1 km², whereas those of Cerisy and HLC were aggregated in a limited area (i.e., along a transect of ≈ 100 m). Krasnov et al. (2007) have shown that a higher host species richness is empirically related to a lower aggregation of *I. ricinus*, at least in larval and nymphal stages. It may therefore be that differences among populations are caused by differences in host species richness. Indeed, the populations of Ecouves and BDS are much more anthropized (i.e., leisure activities) than the two other locations, which could result in significant differences in the range of potential host species that may use the sites. We therefore could have sampled several host races in BDS and Ecouves and only a single pangamic race in Cerisy and HLC. More detailed tests, where ticks are directly sampled from their different local host species, will now be required to test this hypothesis in *I. ricinus*.

Overall, the results obtained during this initial study show that *I. ricinus* may mate according to relatedness in natural populations, at least under certain conditions. There are at least three major implications of this finding. First, in a population at equilibrium, assortative mating will maintain high numbers of homozygotes and thus high variance among genotypes. Although rarely considered, the distribution of genetic

variance within vector populations could be a key factor determining the transmission of associated pathogens (Lambrechts et al. 2005). In the case of *I. ricinus*, this noticeably includes *Borrelia burgdorferi* s.l., the agent of human Lyme borreliosis. Second, at an evolutionary scale, assortative pairing can help to shift to a new assemblage of favorable mutations (Williams and Sarkar 1994). This may affect the dynamics of *I. ricinus* populations by leading to faster rates of host adaptation and as a consequence to higher transmission success for pathogens. Finally, assortative mating has been recognized as a major mechanism of prezygotic isolation in the context sympatric divergence (Bolnick and Fitzpatrick 2007). If confirmed, the existence of genetically isolated subgroups within *I. ricinus* may require the reassessment of our epidemiological perception of diseases transmitted by this tick. In particular, sympatric divergence may imply the existence of independent (or semi-independent) pathogen transmission cycles. To delve into the origin, pervasiveness, and potential consequences of the mating pattern shown in this study for the ecology and evolution of both the tick and the pathogens it carries, a concerted effort will now be needed to test for local population structure throughout the range of this tick.

Acknowledgments

We thank C. Chevillon for discussions and D. Kempf and P. Lambert for sampling assistance. This study was supported by the French Ministry for National Education, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the University of Rennes 1, the Bureau des Ressources Génétiques, the Agence National de la Recherche (ANR-06-JCJC-0095-01), and the working group "Tiques et Maladies à Tiques" of the Réseau Ecologique des Interactions Durables (REID).

References Cited

- Bolnick, D. I., and B. M. Fitzpatrick. 2007. Sympatric speciation: models and empirical evidence. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 38: 459–487.
- Bowcock, A. M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J. R. Kidd, and L. L. Cavalli-Sforza. 1994. High-resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature (Lond.)* 368: 455–457.
- Delaye, C., A. Aeschlimann, F. Renaud, B. Rosenthal, and T. De Meeus. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the *Ixodes ricinus* complex (Acari: Ixodidae). *Mol. Ecol.* 7: 360–361.
- De Meeûs, T., L. Beati, C. Delaye, A. Aeschlimann, and F. Renaud. 2002. Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. *Evolut. Int. J. Org. Evolut.* 56: 1802–1807.
- De Meeûs, T., P. F. Humair, C. Grunau, C. Delaye, and F. Renaud. 2004. Non-Mendelian transmission of alleles at microsatellite loci: an example in *Ixodes ricinus*, the vector of Lyme disease. *Int. J. Parasitol.* 34: 943–950.
- Fagerberg, A. J., R. E. Fulton, and W. C. Black. 2001. Microsatellite loci are not abundant in all arthropod genomes: analyses in the hard tick, *Ixodes scapularis* and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 10: 225–236.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). (<http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>).
- Goudet, J. 2005. HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol. Ecol. Notes* 5: 184–186.
- Healy, J. A., and P. Bourke. 2008. Aggregation in the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae): use and reuse of questing vantage points. *J. Med. Entomol.* 45: 222–228.
- Holm, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6: 65–70.
- Kirkpatrick, M., and V. Ravigné. 2002. Speciation by natural and sexual selection: models and experiments. *Am. Nat.* 159: S22–S35.
- Kiszewski, A. E., F. R. Matuschka, and A. Spielman. 2001. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. *Annu. Rev. Entomol.* 46: 167–182.
- Krasnov, B. R., M. Stanko, and S. Morand. 2007. Host community structure and infestation by ixodid ticks: repeatability, dilution effect and ecological specialization. *Oecologia (Berl.)* 154: 185–194.
- Lambrechts, L., J. Halbert, P. Durand, L. C. Gouagna, and J. C. Koella. 2005. Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 4.
- Magalhaes, S., M. R. Forbes, A. Skoracka, M. Osakabe, C. Chevillon, and K. D. McCoy. 2007. Host race formation in the Acari. *Exp. Appl. Acarol.* 42: 225–238.
- Manly, B.F.J. 1985. The statistics of natural selection. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- McCoy, K. D., T. Boulmier, and C. Tirard. 2005. Comparative host-parasite population structures: disentangling prospecting and dispersal in the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*. *Mol. Ecol.* 14: 2825–2838.
- Medlock, J. M., M. E. Pietzsch, N. V. Rice, L. Jones, E. Kerrod, D. Avenell, S. Los, N. Ratcliffe, S. Leach, and T. Butt. 2008. Investigation of ecological and environmental determinants for the presence of questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) on Gower, South Wales. *J. Med. Entomol.* 45: 314–325.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Roed, K. H., G. Hasle, V. Midtjell, G. Skretting, and H. P. Leinaas. 2006. Identification and characterization of 17 microsatellite primers for the tick, *Ixodes ricinus*, using enriched genomic libraries. *Mol. Ecol. Notes* 6: 1165–1167.
- Troughton, D. R., and M. L. Levin. 2007. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 44: 732–740.
- Wang, J. L. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203–1215.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolut. Int. J. Org. Evolut.* 38: 1358–1370.
- Williams, S. M., and S. Sarkar. 1994. Assortative mating and the adaptive landscape. *Evolut. Int. J. Org. Evolut.* 48: 868–875.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolut. Int. J. Org. Evolut.* 19: 395–420.

Received 21 May 2008; accepted 10 August 2008.

Bilan

L'analyse des stratégies d'appariement d'*I. ricinus* conduisent donc à une conclusion ambiguë. Certains sites montrent une très forte propension à des accouplements assortis, tels qu'attendus sous l'hypothèse de l'existence de races d'hôtes sympatriques, alors que certains autres sites contredisent cette interprétation. Pour la stratégie d'échantillonnage de cette étude nous avons erronément préjugé une réponse univalente (positive ou négative). Rechercher plus directement des races ou groupes de tiques cryptiques au sein des populations nécessiterait des échantillons plus conséquents tels que ceux publiés par De Meeûs *et al.* (2002). A l'époque de la publication de ces résultats, les avancées en statistiques bayésiennes concernant les analyses de clusterisation comme celles implémentées dans le logiciel Structure 2.2. (Pritchard *et al.*, 2000) et BAPS 5.1. (Corander *et al.*, 2006) n'avaient pas atteint le niveau de popularité qu'elles ont aujourd'hui (en particulier, BAPS n'existait pas). Les déficits en hétérozygotes très importants mesurés dans tous les échantillons n'avaient pas pu être entièrement expliqués par des causes techniques telles que les allèles nuls ou la dominance d'allèles courts. Comme va le montrer le chapitre suivant, l'utilisation de ces nouvelles méthodes, en l'occurrence l'algorithme implémenté dans BAPS 5.1. s'est avéré riche d'enseignements sur les causes de ces déficits en hétérozygotes rencontrés de façon récurrente chez cette tique (De Meeûs *et al.*, 2002 ; Kempf *et al.*, sous presse ; Roed *et al.*, 2006).

5.2. *Population structure, Wahlund effects and sex biased dispersal in Ixodes ricinus, the European vector of Lyme borreliosis: new tools for old data* (soumis)

**Population structure, Wahlund effects and sex biased
dispersal in *Ixodes ricinus*, the European vector of Lyme
borreliosis: new tools for old data**

Florent Kempf*, Karen D. McCoy and Thierry De Meeûs

Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses (G.E.M.I), UMR CNRS-IRD 2724, IRD, 911
avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

*: Corresponding author:

Tel: (33) 467 41 62 54 - Fax: (33) 467 41 62 99

Email address: Florent.Kempf@mpl.ird.fr

Keywords: Population genetics, genetic structure, *Ixodes ricinus*, sex-biased dispersal, cluster detection

Running title: Population genetics of *I. ricinus*: new tools for old data

Word count : 2866 words

Abstract

Population genetics can help us to better understand species microevolution and population biology, but inferences made from the genetic polymorphisms of field collected organisms critically relies on sampling design. The population structure of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari, Ixodidae), a commonly encountered ectoparasite and the principal vector of human Lyme disease in Europe, has been the focus of some study, but many ecological aspects of this species remain poorly understood. Here, we employ a bayesian approach to examine within-population structure in *I. ricinus*, and re-analyze patterns of sex-biased dispersal based on this substructure using a previously published microsatellite dataset. We find between 18 and 27 distinct clusters within each of the 12 populations examined. Parallel analyses on a comparable species, the seabird tick *Ixodes uriae*, indicate that these clusters could be associated, in part, with recently derived host-associations, but clusters based on local kin structure can not be excluded. Interestingly, analyses that took the within-population clustering pattern into account showed reversed patterns of sex-biased dispersal at different spatial scales; females disperse more within populations and males among populations. These results raise new questions on the dispersal and host use strategies of *I. ricinus* and the potential importance of these ecological features for disease transmission. Furthermore, this work underlines the importance of taking into account potential patterns of genetic substructure when investigating sex-biased dispersal in natural populations.

Introduction

The study of a species' population structure is a powerful tool to understand the processes shaping an organism's microevolution. Over the past decade, we have seen a marked increase in access to genetic data for non-model organisms, along with the development of sophisticated statistical tools for inferring population level parameters based on this data (for example, population delineation, effective population size, gene flow, reproduction modes: Criscione *et al*, 2005). Such analyses can have practical applications by providing essential information about species of social and economic interest and particularly in cases where other means of study have proved difficult. This is the situation for many pathogenic organisms and their arthropod vectors.

Ixodes ricinus L. (Acari: Ixodidae) is the main European vector of Lyme borreliosis (Eisen and Lane, 2002) and, as such, has attracted the attention of epidemiologists, veterinary and medical researchers (Kurtenbach *et al*, 2002; Randolph *et al*, 2002; Derdáková and Lenčáková, 2005; Pichon *et al*, 2006; Cadenas *et al*, 2007; Faulde and Robbins, 2008; Medlock *et al*, 2008). Despite this attention, and several studies that have examined population structure in this tick (De Meeûs *et al*, 2002; 2004a; 2004b; Delaye *et al*, 1997), much of its basic ecology is as yet unknown (e.g., dispersal strategies, host associations, etc). In an early paper using microsatellite genetic markers, De Meeûs *et al* (2002) found results suggesting the presence of male-biased dispersal in this tick, and detected strong local heterozygote deficiencies at all loci considered that could not be entirely explained by technical biases (De Meeûs *et al*, 2004a). Among the many potential explanations (i.e., selection against heterozygotes, mating system), we were particularly interested in a possible Wahlund effect (1928) that results from sampling ticks of diverse cryptic subgroups. This pattern could reveal the existence of host-associated races, as has been demonstrated for *Ixodes uriae*, a seabird tick and marine vector of Lyme borreliosis (McCoy *et al*, 2001; 2005b), or the occurrence of local kin structure.

In the present study, we revisit the microsatellite data of De Meeûs *et al* (2002) using most recent inference tools in order to assess the possible existence of local subgroups in *I. ricinus*. In particular, we analyse this data using the clustering software BAPS 5.1. (Corander *et al*, 2004) to examine the number and nature of within-population subgroups. We undertook a similar analysis using data from *Ixodes uriae*, where host specialization (i.e., the existence of sympatric host races) is well-documented (McCoy *et al*, 2001; 2005b), to test the ability of the software to detect subgroups within a geographic location. In *I. ricinus*, we also reinvestigated signatures of sex-biased dispersal (De Meeûs *et al*, 2002) among the subgroups defined by BAPS 5.1. to determine how the existence of these groups may affect inferences made based on genetic data.

Materials and methods

Datasets

725 adult *I. ricinus* ticks were sampled on the vegetation by De Meeûs *et al* (2002) during the springs of 1995 (three sites, N=164 ticks) and 1996 (nine sites, N=561 ticks) in Switzerland (Figure 1) and directly on cattle in Tunisia (one site sampled in 1996) for a total of 12 subsamples over the two years. Among these ticks, there were 416 males and 309 females. Ticks were then genotyped at 5 microsatellite loci (see De Meeûs *et al* (2002) for technical details).

776 *I. uriae* individuals were sampled in 22 different populations in Western Europe and Canada (Figure 2), between 1997 and 2001 by McCoy *et al* (2005a; 2001; 2003; 2005b). We also used original data from three additional populations, Hermaness (Scotland, 60° 50'N. 00° 55'W), Grunay (Scotland, 60° 39'N. 01° 18'W) and Great Saltee (Ireland, 52° 07'N. 06° 37'W) (these sites are referred to here as HE, GR and GS respectively; Figure 2) (McCoy, unpublished). *I. uriae*

were sampled directly from three species of colonial seabirds: the Blacklegged Kittiwake *Rissa tridactyla* (n=406 individual ticks), the Atlantic Puffin *Fratercula arctica* (n=149) and the Common Murre *Uria aalge* (n=221). In several cases, ticks were sampled from different host species within the same colony. For the sake of comparison with *I. ricinus*, we used data from only five of the eight microsatellite loci designed for this species (McCoy and Tirard, 2000). The loci were selected so that local genetic diversities were similar to those found for *I. ricinus* (T5, T35, T38, T39b, T47).

Cluster analysis

We used the bayesian approach described by Corander (2006) to detect subgroups in *I. ricinus* and *I. uriae* populations. This approach considers genetic structure as a parameter, estimated according to the joint posterior distribution of the substructure and allele frequencies within subpopulations. The inferred pattern of population clustering results from the comparison among the posterior probabilities of different putative numbers of clusters, which range from zero to a maximal number specified by the user. Here, this upper limit was set to 30, but was never reached in any of the performed cluster analyses. Each analysis was repeated 50 times, at which point we did not observe any significant change in the number and composition of the inferred clusters. These computations were performed using the software BAPS 5.1. (Corander *et al*, 2004; 2006).

We next investigated to what extent the substructure found was sufficient to explain observed local heterozygote deficiencies, measured using Wright's F_{IS} (Wright, 1965) (see Ravel *et al* (2007) for an example). We first estimated F_{IS} at each locus and overall loci for the raw population data using Weir and Cockerham's method (1984). We next tested if the F_{IS} was

significantly different from zero by randomizing alleles among individuals within each sample (15,000 permutations). We then estimated the F_{IS} overall clusters and for each locus, and tested for their significance. In this case, randomization tests permuted alleles among individuals within each cluster. These computations were performed using Genetix 4.05 (Belkhir *et al*, 1996-2004) which allows the user to compute F_{IS} estimations over a high number of populations. We then tested for homogeneity between the F_{IS} computed on initial data and clustered data using a unilateral Wilcoxon signed rank test for paired data (H_1 : f are lower in the clustered samples), the pairing unit being the locus. This test was performed using the software S-PLUS 2000 Professional release 2 (MathSoft, Inc.).

In order to visualise how genetic variation was partitioned across clusters, and thus make inferences on the possible processes behind the formation of these clusters, genetic distances among clusters were estimated using Cavalli-Sforza and Edwards' chord distance (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967; Takezaki and Nei, 1996), computed using Genetix 4.05. Relationships among clusters were summarized in a NJ (Neighbour Joining) tree, generated using MEGA 3.1 (Kumar *et al*, 2008) and TreeDyn (Chevenet *et al*, 2006).

Sex-biased dispersal in Ixodes ricinus

Sex-biased dispersal was assessed using three tests implemented in FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2002). First, Weir and Cockerham's (1984) estimate of F_{ST} , a measure of the differentiation among populations (Wright, 1965), was calculated for each sex. Next, tests based on the mean (mAI_c) and the variance (vAI_c) of Favre *et al*'s (1997) corrected assignment index AI_c were performed (see Prugnolle and De Meeûs (2002) for more details on these tests). All three tests are based on a permutation procedure: the sex of each individual is randomly re-assigned in

each population (10,000 randomisations). The observed difference between male and female F_{ST} , and the AI_C -based t -statistics defined by Goudet (2002) were then compared to the resulting chance distributions.

We first carried out these tests on the raw population data, as done by De Meeûs *et al* (2002). Second, we checked for a signature of sex-biased dispersal among the clusters within each of the 12 populations independently. The P -values of the 12 tests were combined using Fisher's method (Fisher, 1970) : the quantity $\sum_{k=1}^{12} -2 \times \log(P_k)$ (P_k referring to the k^{th} P -value) was compared to the Chi square distribution with 24 degrees of freedom. For these computations, unisexual clusters were non-informative and were removed from the dataset.

Finally, sex-biased dispersal was then retested at an appropriate spatial scale (as defined by De Meeûs *et al* (2002)). Indeed, population structure can be pronounced at large scales and can hinder the signature of sex-biased dispersal (see Goudet *et al* (2002)). We therefore only included samples from the same collection year and from within the north-western zone of Switzerland (i.e., samples M96, N96, B96, S96 and E96) (Figure 1). At this spatial scale, we re-examine sex-biased dispersal at the among-population level and taking into account local substructure. We selected a single individual of each sex from each cluster (when possible). Individuals with the most complete genotypes were preferentially chosen in order to maintain maximum power. Unilateral tests for sex-biased dispersal for the hypothesis that males disperse more were performed over the five populations and compared to previous estimates.

Results

Cluster analysis

We detected between 18 and 27 clusters per population using the *I. ricinus* microsatellite data. We found significant heterozygote deficiencies within these clusters overall loci (average $F_{IS}=0.1515$, $P\text{-value}\leq 0.0001$). However, these estimates were significantly lower than those found using the raw data (average $F_{IS}=0.3790$, $P\text{-value}\leq 0.0001$) (Figure 3; Wilcoxon signed-rank test, $P\text{-value}=0.032$). Local sub-structuring therefore seems to account for a large part of the previously reported heterozygote deficiencies.

For *I. uriae*, results confirmed the capability of BAPS 5.1. to discriminate host related-divergence within populations. Although the number of clusters did not strictly reflect the three host races, individual ticks exploiting the same host species were typically found together in the same cluster (see Figure 4 for an example of samples collected in one multi-host colony). The occasional occurrence of ticks from other host groups within a cluster is coherent with previous results suggesting that host specialisation is not complete (McCoy *et al*, 2005b). For this species, within population clusters were able to completely explain observed heterozygote deficiencies in the raw dataset ($F_{IS}=0.113$, in the raw dataset; $F_{IS}= -0.090$ in the clustered dataset).

For the comparative results of the two tick systems, we only present the results obtained for two samples of comparable size (Figure 4): Hornøya (Norway) for *I. uriae* (n=146 ticks, sampled in 1998) and Staadswald (Switzerland) for *I. ricinus* (n=100 ticks, sampled in 1996). Nevertheless, the results of the complete analyses are available as supplementary material (Figures S2 and S3). In both species, clusters never form deeply rooted groups that may be associated with large-scale host-associated structure and both show similar distances among clusters. This suggests that the detected substructure (host-related or not) has occurred on an ecological time scale, (i.e. in a order of magnitude of several generations (Gingerich, 2001; Hairston Jr *et al*, 2005)).

De Meeûs *et al* (2002) found a significant signature of sex-biased dispersal with the mAI_C -based test. In the present study, we found similar results with this test, whereas both the F_{ST} -based test and the vAI_C -based test were non-significant (the vAI_C -based test even suggested a reversed pattern of sex-biased dispersal) (Table 1). Interestingly, these results are in contrast with the predictions from Goudet *et al* (2002): F_{ST} and vAI_C -based tests should reveal sex-biased dispersal before the other tests.

When examining sex-biased dispersal in the clustered data, where independent tests performed at the within-population scale are summarized across populations using Fisher's method (Fisher, 1970), a reversed pattern was found (i.e. males disperse less among clusters) for all the statistics considered (Table 1). Finally, when the effect of the within-population clustering was removed by considering only one individual per sex per cluster for each population, the initial conclusion was restored, where males disperse more among populations (Table 1).

Discussion

Here, we show evidence that hidden genetic structure can produce an important Wahlund effect within tick populations. This Wahlund effect explains a significant part of the heterozygote deficiencies observed in natural populations of *Ixodes ricinus* (De Meeûs *et al*, 2002; 2004a) (i.e. a 60% reduction) and completely explained deficiencies found in *I. uriae* when host-associated groups were not accounted for. In *I. uriae*, these clusters largely reflect the divergence of different host races (e.g., ticks sampled on the same host species in different sites were often found within the same cluster). We found similar results in the two main samples of *I. ricinus* and *I. uriae*

(respectively Staadswald and Hornøya) using an other clustering method, implemented in STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al*, 2000), although the drop in F_{IS} was less important (not shown). We can therefore conclude that the method employed here to investigate the genetic diversity of both model species could successfully detect within population structure of significant biological interest (e.g. host-related subgroups in the case of *I. uriae*).

In both species examined, the branch lengths among within-population clusters were similar, with relatively short genetic distances among clusters. If clusters represented large-scale patterns of divergence, such as host-associated subspecies, we would have expected deep divergences among local clusters. We can therefore hypothesize that the origin of the within-population substructure in *I. uriae* and *I. ricinus* is recent. In *I. uriae*, this observation corresponds well to results found throughout its range that suggest that host race formation is recurrent and has occurred recently (McCoy *et al*, 2005b). In *I. ricinus*, substructure could have several possible origins, such as host-associations or local kin groups. These alternative hypotheses require explicit testing.

The study of De Meeûs *et al* (2002) inferred sex-biased dispersal from a highly significant mAI_C -based test. We found this to be the most powerful test revealing a signature of male-biased dispersal at the among-population level. However, when the dataset was clustered, the three tests used revealed a reversed pattern of sex-biased dispersal, where females disperse more at the within-population scale. This result shows that a second previously undetected sex-linked phenomenon is occurring at the within-population level. When we then reduced the number of individuals in a cluster to a single individual of each sex, we were able to remove this effect and again detected evidence of male-biased dispersal among populations. In none of the cases (raw, clustered, and reduced datasets), the vAI_C -based gave significant results: this may reflect high levels of dispersal for both sexes (i.e. $d > 0.1$), as this test is expected to perform best when dispersal is very low (Goudet *et al*, 2002).

Many different sex-related proximate factors could explain the puzzling observations made at the within-population level (e.g., cooperation within a sex, sex-related dispersal strategies, competitive exclusion of one sex: see (Lawson Handley and Perrin, 2007; Prugnolle *et al*, 2003). For example, *I. ricinus* is known to exploit a large variety of hosts (mammals, birds, lizards: see Eisen & Lane (2002). If we assume that immature male ticks preferentially exploit high dispersing hosts like birds, whereas female ticks prefer relatively sedentary hosts such as rodents (first suggested by De Meeûs *et al*, 2002), we can imagine that these patterns could be linked to host-related movement, where birds disperse more frequently between patches whereas rodents are restricted within patches. Moreover, long range dispersal could have other consequences for males ticks. First, as *I. ricinus* has very low autonomous dispersal capabilities, particularly in the early life stages (Sonenshine, 1993), we could expect that sibling ticks may often exploit the same host individual for their first blood meal (i.e., as larva). The use of a highly dispersing host could mean that the probability of mortality after detachment is higher for males (for example, higher probability for a detached tick to end up in an unsuitable site). In this case, only a few groups of (potentially related) males would successfully migrate to a patch compared to a larger resident female population. This differential mortality could increase the differentiation among local male clusters relative to females.

Explicit tests in natural populations will now be required to distinguish among these hypotheses and, in particular, to test for sex-biased host specificity in *I. ricinus*. However, regardless of the source of cryptic subdivision, this result highlights the need to revisit the population biology of *I. ricinus* under natural conditions. This substructure also requires that we investigate the possible relationships between these subgroups and the wide variety of pathogens that this tick transmits, including *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the pathogenic agent of human Lyme disease. For example, one could ask whether different local subgroups show differences in competence for different *B. burgdorferi* s.l. genospecies (Derdáková and Lenčáková, 2005) and how they differ in their contribution to the maintenance and emergence of pathogen diversity

(Gooding, 1996 ; McCoy, 2008). Finally, taken as a whole, our results provide useful information on the power and limitations of the sex-biased dispersal tests considered. In *I. ricinus*, the existence of scale-specific patterns of sex-related phenomena could modify our understanding of these processes. One should therefore be particularly cautious when genetic markers show high levels of heterozygote deficiencies, unexplained by technical biases (e.g. null alleles, short allele dominance), as they may reveal hidden genetic structure. The joint use of clustering methods (e.g. Corander *et al* (2004), Pritchard *et al* (2000); see Latch *et al* (2006) for a comparative study) and more traditional population genetic tools appears thus to be a powerful means of analysing population genetic structure and to disentangle sex-linked processes acting at different spatial scales.

Acknowledgements

We thank T. Boulinier, N. Galtier, J. Michaux, B. Godelle and the members of the “Ticks and tick-borne disease” working group of the Réseau Ecologique des Interactions Durables (REID) for useful discussions. Analyses were financed by grants received from the “Bureau des Ressources Génétiques” (Project °54), the “Agence National de la Recherche (ANR-06-JCJC-0095-01)” and the “Institut Polaire Français – Paul Emile Victor” (Programme n°333). Florent Kempf was supported by the French Ministry for National Education..

Supplementary information is available at Heredity’s website.

References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Cadenas FM, Rais O, Jouda F, Douet V, Humair PF, Moret J *et al* (2007). Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J Med Entomol* 44(4): 683-693.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AW (1967). Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 19(3 Pt 1): 233-257.
- Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinf* 7: 439.
- Corander J, Marttinen P, Mantyniemi S (2006). A Bayesian method for identification of stock mixtures from molecular marker data. *Fishery Bull* 104(4): 550-558.
- Corander J, Waldmann P, Marttinen P, Sillanpaa MJ (2004). BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinf* 20(15): 2363-2369.
- Criscione CD, Poulin R, Blouin MS (2005). Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol Ecol* 14(8): 2247-2257.
- De Meeûs T, Beati L, Delaye C, Aeschlimann A, Renaud F (2002). Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. *Evolution Int J Org Evolution* 56(9): 1802-1807.
- De Meeûs T, Humair PF, Grunau C, Delaye C, Renaud F (2004a). Non-Mendelian transmission of alleles at microsatellite loci: an example in *Ixodes ricinus*, the vector of Lyme disease. *Int J Parasitol* 34(8): 943-950.
- De Meeûs T, Lorimier Y, Renaud F (2004b). Lyme borreliosis agents and the genetics and sex of their vector, *Ixodes ricinus*. *Microbes Infect* 6(3): 299-304.

- Delaye C, Béati L, Aeschlimann AA, Renaud F, De Meeûs T (1997). Population genetic structure of *Ixodes ricinus* in Switzerland from allozymic data: no evidence of divergence between nearby sites. *Int J Parasitol* 27(7): 769-773.
- Derdáková M, Lenčáková D (2005). Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann Agric Environ Med* 12(2): 165-172.
- Eisen L, Lane RS (2002). Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Gray J, Kahl O, Lane RS and Stanek G (eds) *Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control*. CABI Publishing: Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- Faulde MK, Robbins RG (2008). Tick infestation risk and *Borrelia burgdorferi* s.l. infection-induced increase in host-finding efficacy of female *Ixodes ricinus* under natural conditions. *Exp Appl Acarol* 44(2): 137-145.
- Favre L, Balloux F, Goudet J, Perrin N (1997). Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocodylus russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. *Proc Roy Soc Lond B* 264: 127-132.
- Fisher RA (1970). *Statistical Methods for Research Workers*, 14th Edit. edn. Oliver and Boyd: Edinburgh, United Kingdom.
- Gingerich PD (2001). Rates of evolution on the time scale of the evolutionary process. *Genetica* 112-113: 127-144.
- Gooding RH (1996). Genetic Variation in Arthropod Vectors of Disease-Causing Organisms: Obstacles and Opportunities. *Clin Microbiol Rev* 9(3): 301-320.
- Goudet J (2002). FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices . Ver. 2.9.3.2.
- Goudet J, Perrin N, Waser P (2002). Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Mol Ecol* 11(6): 1103-1114.

- Hairston Jr NG, Ellner SP, Geber MA, Takehito Y, Fox JA (2005). Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecol Lett* 8: 1114-1127.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*.
- Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schafer SM, Sewell HS, Brade V *et al* (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. *Trends Microbiol* 10(2): 74-79.
- Latch EK, Dharmarajan G, Glaubitz JC, Rhodes OE (2006). Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Cons Genet* 7(2): 295-302.
- Lawson Handley LJ, Perrin N (2007). Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Mol Ecol* 16(8): 1559-1578.
- McCoy KD (2008). The Population Genetic Structure of Vectors and our Understanding of Disease Epidemiology. *Parasite* 15(3): 444-448.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C (2005a). Comparative host-parasite population structures: disentangling prospecting and dispersal in the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*. *Mol Ecol* 14(9): 2825-2838.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, Michalakis Y (2001). Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *J Evol Biol* 14: 395-405.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, Michalakis Y (2003). Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution* 57(2): 288-296.

- McCoy KD, Chapuis E, Tirard C, Boulinier T, Michalakakis Y, Bohec CL *et al* (2005b). Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proc Roy Acad Lond B* 272(1579): 2389-2395.
- McCoy KD, Tirard C (2000). Isolation and characterisation of microsatellites in the seabird ectoparasite *Ixodes uriae*. *Mol Ecol* 9: 2213-2214.
- Medlock JM, Pietzsch ME, Rice NVP, Jones L, Kerrof E, Avenell D *et al* (2008). Investigation of Ecological and Environmental Determinants Presence of Questing *Ixodes ricinus* (Acari: on Gower, South Wales. *J Med Entomol* 45(2): 314-325.
- Pichon B, Kahl O, Hammer B, Gray JS (2006). Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6(4): 382-387.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959.
- Prugnolle F, de Meeûs T (2002). Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity* 88(3): 161-165.
- Prugnolle F, Durand P, Theron A, Chevillon C, de Meeus T (2003). Sex-specific genetic structure: new trends for dioecious parasites. *Trends Parasitol* 19(4): 171-174.
- Randolph SE, Green RM, Hoodless AN, Peacey MF (2002). An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 32(8): 979-989.
- Ravel S, de Meeûs T, Dujardin JP, Zeze DG, Gooding RH, Dusfour I *et al* (2007). The tsetse fly *Glossina palpalis palpalis* is composed of several genetically differentiated small populations in the sleeping sickness focus of Bonon, Cote d'Ivoire. *Infect Genet Evol* 7(1): 116-125.
- Sonenshine DE (1993). *Biology of ticks.*, Vol 2. Oxford University Press: Oxford, United Kingdom, 465pp.

- Takezaki N, Nei M (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
- Wahlund S (1928). Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11: 65-108.
- Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution Int J Org Evolution* 38(6): 1358-1370.
- Wright S (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution Int J Org Evolution* 19: 395-420.

Table 1: Results of sex-biased dispersal tests performed on raw, clustered, and reduced clustered datasets of *Ixodes ricinus*. Clustered tests examined sex-biased dispersal at the within-population level. The value of the test statistic in the table is a mean over all 12 populations, and the resulting unilateral P -value was computed using Fisher's procedure (see Material and Methods). Finally, clusters were reduced by removing all but one individual per sex in each cluster (see Material and Methods) and sex-biased dispersal tests were performed again (see Material and Methods for details). All significant tests are in bold. Underlined tests indicate the most dispersive sex; for the F_{ST} and mAI_c -based tests, this is defined by the lowest test statistic value, whereas for vAI_c it is defined by the highest test statistic value.

		F_{ST}	mAI_c	vAI_c
Raw data	Females	0.003	0.43	<u>9.81</u>
	Males	<u>0.002</u>	-0.75	9.30
	P -value	0.81	0.0003	0.70
Clustered data	Females	<u>0.26</u>	-0.15	<u>0.78</u>
	Males	0.31	0.16	0.62
	P -value	0.08	0.005	0.16
Reduced clustered data	Females	-0.005	0.40	<u>7.28</u>
	Males	<u>-0.014</u>	-0.50	6.71
	P -value	0.11	0.02	0.69

Figure legends

Figure 1: Sampled populations of *I. ricinus* in Switzerland in 1995 and 1996. With the Tunisian sample, the complete dataset included 12 subsamples. Three swiss sites were sampled in both years (indicated by *) and are treated as separate subsamples.

Figure 2: Sampled populations of *I. uriae*. We used the location codes defined by McCoy et al. (McCoy *et al*, 2001; 2003; 2005a; 2005b). We added three population samples to the original dataset: Hermaness (HE), Great Saltee (GS) and Grunay (GR) (see Material and Methods for details).

Figure 3: Average F_{IS} estimates for each locus across populations using raw and clustered data. Confidence intervals were obtained for each locus by jackknifing over populations, and over loci for all populations (All Loci). All F_{IS} estimates were highly significant in both raw and clustered datasets (all P -values < 0.01), except for IR08 using clustered data (P -value = 0.89).

Figure 4: Neighbour-Joining trees (NJTREE) based on Cavalli-Sforza and Edward's distance matrices among clusters for the Staadswald sample of *I. ricinus* (a) and the Hornøya (HN) sample of *I. uriae* (b). Histogram bars are proportional to the number of individuals included in each cluster. The host species of the *I. uriae* ticks are represented in different colours. Complete NJTREES including all populations are available as supplementary Figures S1 and S2.

Figure 1

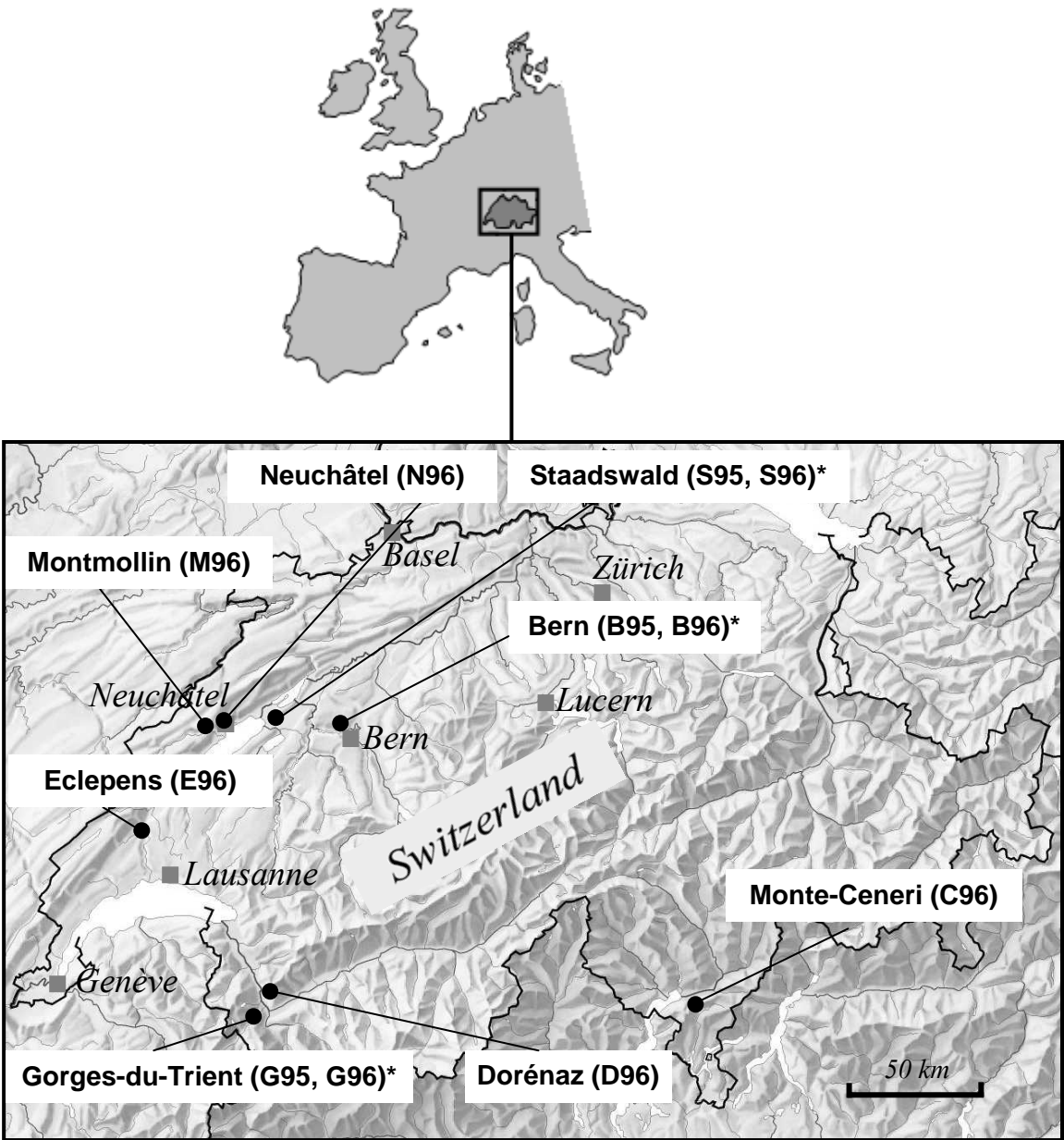


Figure 2

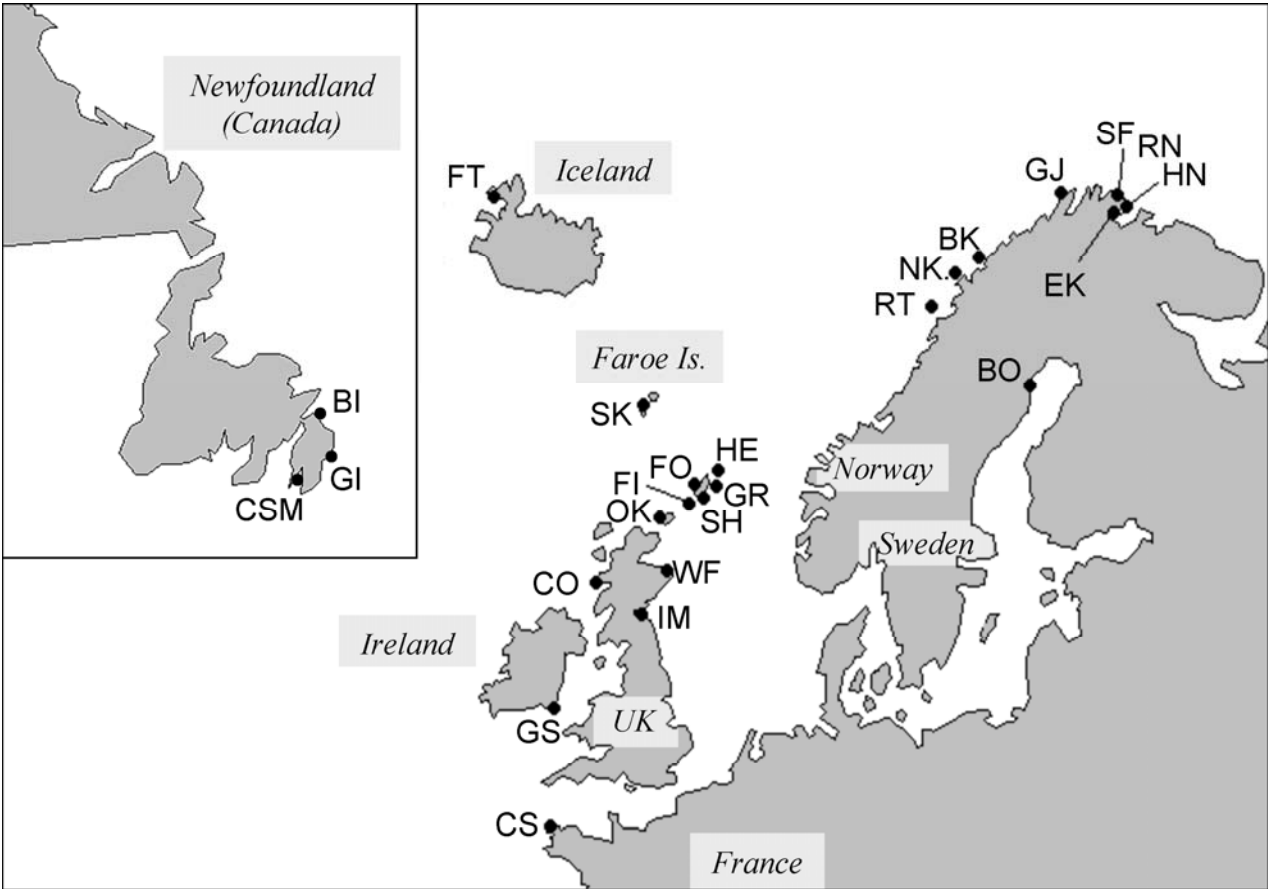


Figure 3

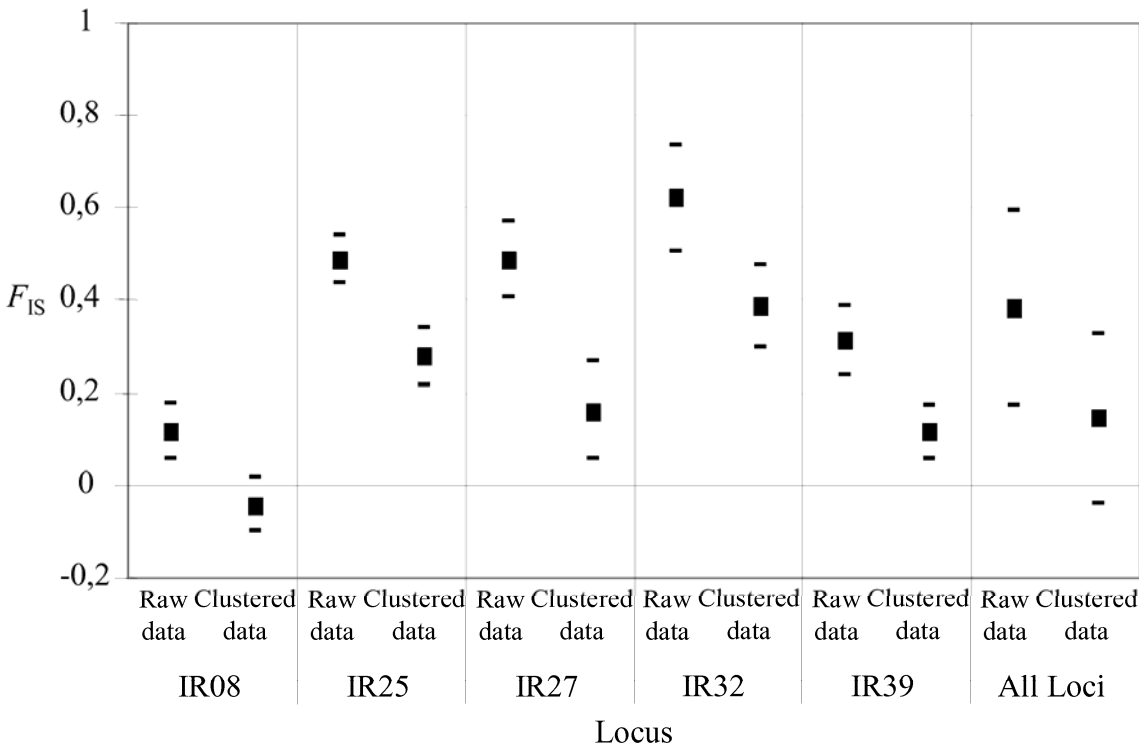
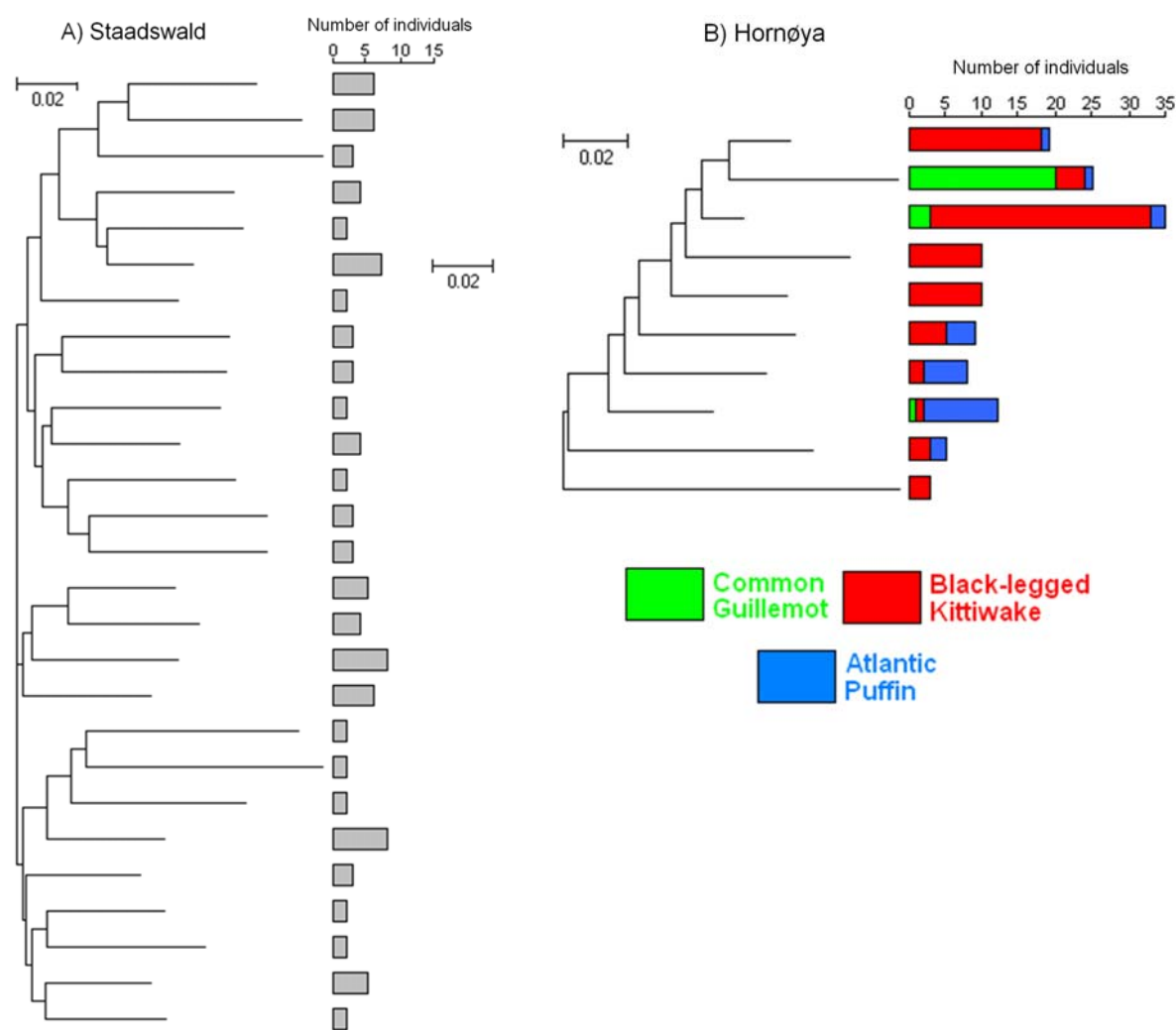


Figure 4



Supplementary material

Figure S1: Neighbour-Joining tree corresponding to the genetic relationships among the clusters detected within each of the 25 *Ixodes uriae* populations (see Figure 2 for locations). The histogram represents the size and host of origin for the ticks of each cluster. We also report the geographical origin of each cluster (see colour codes).

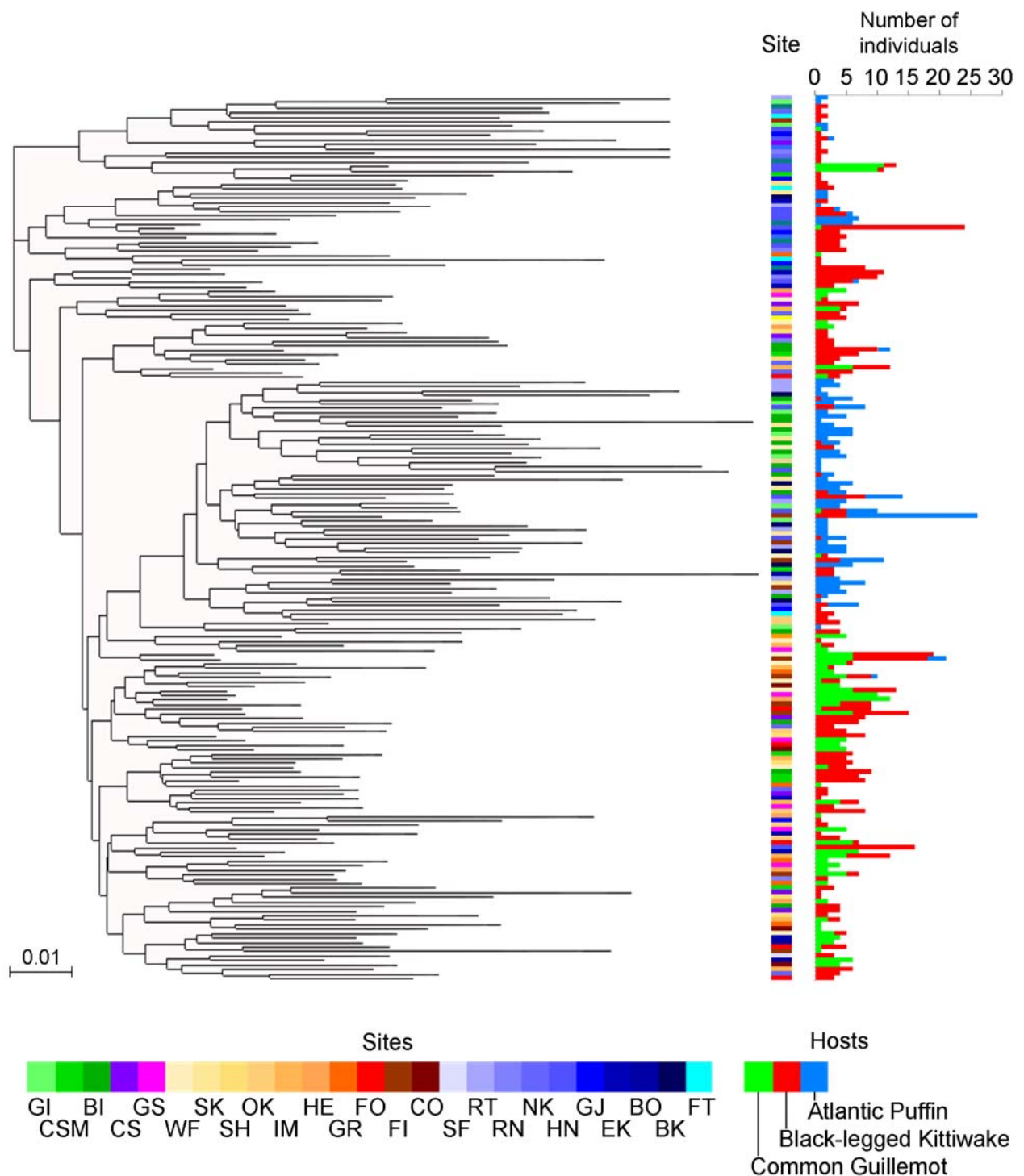
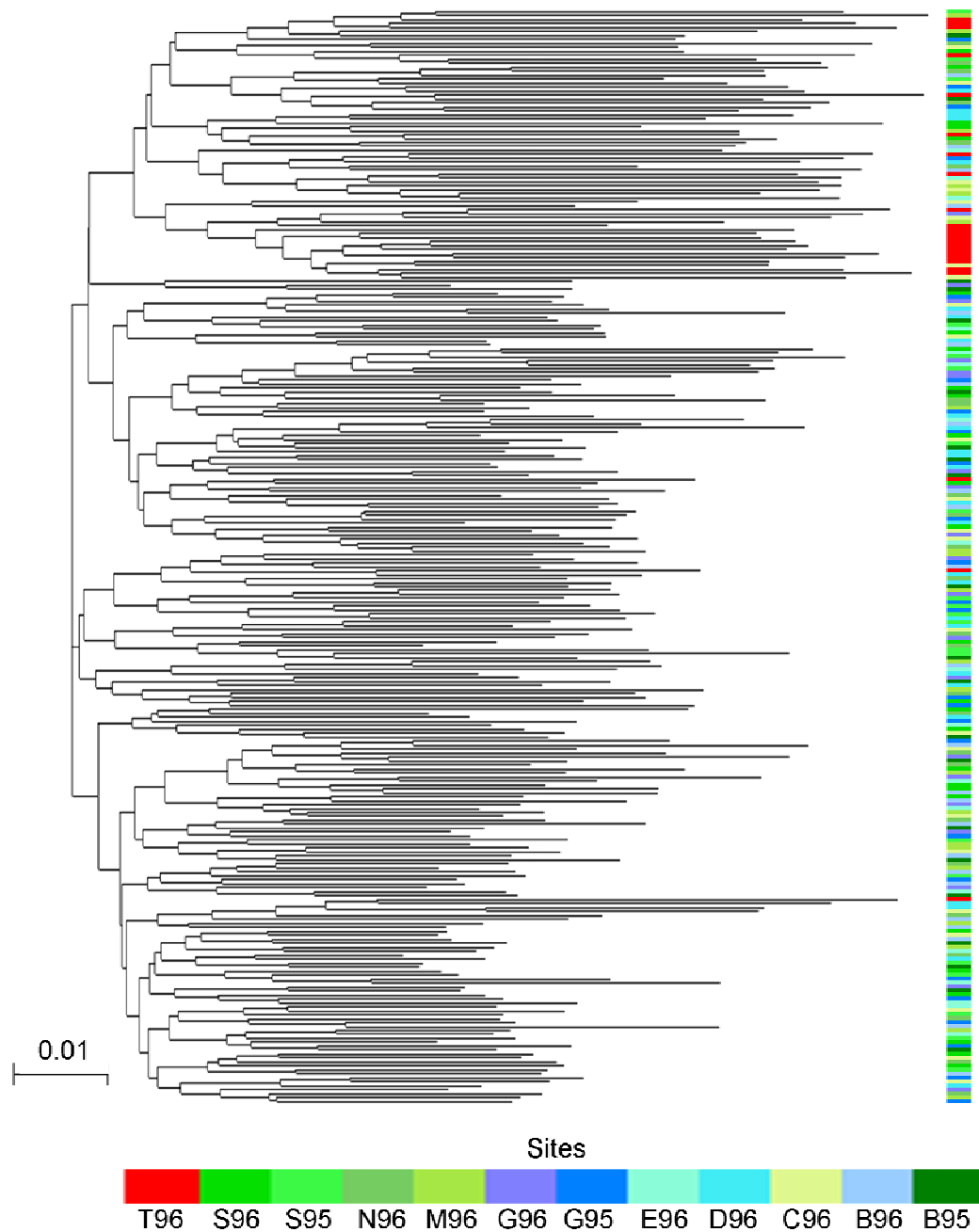


Figure S2: Neighbour-Joining tree corresponding to the genetic relationships among the clusters detected within the 12 *Ixodes ricinus* populations (T96 correspond to the Tunisia sample). The colours represent the geographical origin of each cluster (see colour codes).



Bilan

La réponse obtenue par l'approche de clusterisation apporte des résultats intéressants mais une fois encore ambiguës puisqu'ils ne permettent ni de confirmer ni d'infirmer l'existence de sous-groupes sympatriques d'*I. ricinus* plus ou moins bien adaptés à différents hôtes. Il n'en reste pas moins que si race d'hôtes il y a, celles-ci seront vraisemblablement moins clairement observables que dans le cas d' *I. uriae* eu égard aux autres phénomènes qui paraissent modeler de façon significative la distribution de l'information génétique dans et entre sites géographiques, entre sexes, entre individus hôtes et probablement entre stades de cette tique. La vérification sur des individus tiques collectés sur les hôtes eux-mêmes représente plus que jamais un objectif dont on ne peut plus faire l'économie.

5.3. *Is the European vector of Lyme borreliosis, Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae), a true generalist tick?* (en préparation)

Is the European vector of Lyme borreliosis, Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae), a true generalist tick ?

Florent Kempf^{a,*}, Thierry De Meeûs^b, Veronika Taragel'ová^c, Olivier Plantard^d, Dieter Heylen^e, Cyril Eyraud^f and Karen D. McCoy^a

* Corresponding author

^a *G. E. M. I. (Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses), UMR CNRS-IRD 2724, IRD, 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394, Montpellier Cedex 5, France.*

^b *Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES) 01 BP 454, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso.*

^c *Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, Bratislava, 84506, Slovakia.*

^d *BioEpAR (Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque en santé animale), UMR INRA/ENVN 1300, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Atlanpole – La Chantrerie, BP 40706, 44307, Nantes Cedex 3, France.*

^e *Department of Biology, University of Antwerp-Campus Drie Eiken, Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk, Belgium.*

^f *Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, CNERA Avifaune Migratrice, Station de Chizé, 79360, Villiers-en-Bois, France.*

Abstract

Ticks are widely distributed vectors that transmit many pathogenic agents of medical and economic interest, including the bacteria causing the human Lyme disease (*Borrelia burgdorferi* sensu lato). For these micropathogens, the potential of the vectors to adapt to novel hosts, and to respond to changes in host community structure, may have profound effects on their maintenance in natural populations. In this paper, we investigated host-associated genetic structure in *Ixodes ricinus*, the main European vector of *B. burgdorferi* s.l. and a tick that is considered to be an extreme host generalist. We analysed genetic variability at seven microsatellite markers in a large sample of ticks collected directly from trapped wild animals (birds, rodents, lizards, wild boars and roe deer) in five sites in Western and Central Europe. Based on these data, we show significant levels of genetic structure among host individuals and host types. These results suggest that host choice is far from random in *I. ricinus* and will likely have significant consequences for the population dynamics of the ticks and the transmission of their microparasites. First, the degree of susceptibility among local host individuals may greatly shape the genetic structure within populations. Second, the formation of specialized host races may result in the isolation of different local pathogens and may explain previous epidemiological observations in Lyme disease bacteria. More generally, our results suggest that host specialization is more common in ticks than previously thought and that local host-associated divergences in these vectors will need to be accounted for more explicitly in our epidemiological models of disease.

Introduction

Ticks are parasites of great interest in both applied and fundamental sciences. These organisms represent a wide array of life cycles, exploit a large range of host species and are second only to mosquitoes in their importance as vectors of human disease agents (Parola, Raoult, 2001). Moreover, tick-borne diseases of cattle cause economic losses estimated in billions of dollars worldwide (e.g., bovine anaplasmosis and babesiosis: Sonenshine, 1993). Thus, ticks of the *Ixodes ricinus* complex are of notable significance: they are present across the Northern hemisphere and transmit a great variety of pathogens of medical and veterinary importance (Cotté *et al.*, 2008; Eisen, Lane, 2002; Stańczak *et al.*, 2004). In particular, *I. ricinus* ticks are the main vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the bacteria responsible for human Lyme borreliosis (Eisen, Lane, 2002; Rich *et al.*, 1995) and the most important vector in the Northern hemisphere in terms of medical and economic impacts (Gubler, 1998). In Western Europe, Lyme borreliosis is transmitted by the species *Ixodes ricinus*, one of 14 species included in the complex and a species that is considered to be an extreme host generalist. Many studies have investigated the population dynamics, ecology, and basic biology of *I. ricinus*, along with its interaction with *B. burgdorferi* s. l. (Kurtenbach *et al.*, 2002; Derdáková, Lenčáková, 2005; Cadenas *et al.*, 2007; Faulde, Robbins, 2008; Pichon *et al.*, 2006). Nonetheless, we still have limited knowledge about how this tick interacts locally with its different potential host species and the consequences of host exploitation for disease transmission. One way to address these questions is by examining the population genetic structure of ticks in association with host exploitation within a given geographic location. To date, most genetic analyses in this tick, and in many other tick systems, have focused on interspecific variation or large scale patterns of genetic variation among populations (e.g. Casati *et al.*, 2008; De Meeûs *et al.*, 2002; Kain *et al.*, 1999; Paulauskas *et al.*, 2006) (but see Kempf *et al.*, 2008; Koffi *et al.*, 2006; McCoy *et al.*, 2005). However, genetic variation within vector populations may have profound consequences on our perception of the basic biology of these organisms, and for the epidemiology of associated pathogens (Gooding, 1996; McCoy, 2008).

Previous population genetics studies of *I. ricinus* have shown unexpectedly high levels of heterozygote deficiencies (De Meeûs *et al.*, 2002, 2004; Delaye *et al.*, 1997; Kempf *et al.*, 2008; Roed *et al.*, 2006). One cause for a difference between expected and observed heterozygosities can be the erroneous sampling of individuals from different isolated sub-groups (i.e., a Wahlund effect). In line with this hypothesis, recent work has shown the existence of cryptic sub-groups within *I. ricinus* populations (Kempf *et al.* submitted) and a pattern of assortative mating between related males and females in certain sampling sites (Kempf *et al.*, 2008). One explanation for such patterns is the existence of local host specialized groups, as ticks may be particularly prone to host specialisation (Magalhaes *et al.*, 2007; McCoy *et al.*, 2001, 2005; De Meeûs *et al.*, submitted). Evidence of host specialization in *I. ricinus* could shed a new light on the biology of this species and on the epidemiology of the pathogens it transmits, including the agents of Lyme borreliosis.

In the present paper, we investigated the distribution of genetic variation in seven microsatellite markers among a large sample of *I. ricinus* ticks directly sampled on their hosts. Five major host types were considered: roe deer, wild boars, rodents, birds and lizards. High levels of heterozygote deficits caused by the presence of null alleles were found and may have hindered the detection of genetic structure in *I. ricinus*. Nevertheless, the patterns of genetic variation observed strongly suggest (1) a significant role of host individuals and (2) the existence of host-associated differentiation in local *I. ricinus* populations (i.e., host-associated races). We discuss the epidemiological and evolutionary implications of our results.

Material and Methods

Sampling and Study Sites

We sampled a total of 602 ticks between 2002 and 2007 (Table 1) from a variety of wild animals in five sites in Western and Central Europe (Figure 1). The host species included five main host types: bird (*Turdus philomelos*, *T. merula*, *Erithacus rubecula*, *Luscinia megarhynchos*, *Sylvia atricapilla*, *S. communis*, *Phylloscopus collybita*, *Parus major*, *Anthus pratensis*, *A. trivialis*, *Nannus troglodytes*), lizard (*Lacerta viridis*), rodent (*Apodemus sylvaticus*, *A. agrarius*, *A. flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boar (*Sus crofa*). The sampled ticks included all life stages (larva, nymph, and adult) and were stored in 90% ethanol until DNA extraction.

Genotyping

Conserved ticks were washed three times in distilled water to eliminate ethanol and were cut in half. One half was ground with a mixer mill 301 (Retsch, Germany) and DNA was extracted using a Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA). Ticks were genotyped at 7 microsatellite loci: IRN15, IRN37 (Roed *et al.*, 2006), IR25, IR27, IR39, IR32 (Delaye *et al.*, 1998), following the PCR protocols proposed by the authors. Marker IRN15 was found to be duplicated within the genome of *I. ricinus*, and was therefore split into two distinct markers, IRN15a and IRN15b. Genotypes were visualized using an automated sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA).

Data Analysis

We tested for the occurrence of linkage disequilibrium between all pairs of loci by randomizing single locus genotypes among individuals within each site. We used the procedure implemented in the software Genetix 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004) with a total of 10^5 permutations of genotypes among individuals within each population.

In this study, a population was defined as a group of ticks sampled in a given site, in a given year, from the same host type and of the same life stage. We measured departure from Hardy-Weinberg equilibrium within each of these populations, using Wright's F_{IS} (Wright, 1965), and the differentiation among populations using Wright's F_{ST} . Estimations followed Weir & Cockerham's method (Weir, Cockerham, 1984) and were carried out using the software Genetix 4.05. The significance of F_{IS} was deduced by the comparison of the observed value to its chance distribution resulting from the random permutation of alleles among individuals within each sample (15,000 permutations). The significance of F_{ST} was similarly assessed using a permutation procedure of individuals among populations (15,000 permutations). Gene diversity was also measured for each population (unbiased genetic diversity index H_s ; Nei, 1987) using Genetix 4.05.

The presence of null alleles can produce false homozygote and blank (null homozygote) genotypes and are known to occur in *I. ricinus* (De Meeûs *et al.*, 2002; Delaye *et al.*, 1997; Roed *et al.*, 2006). We estimated null allele frequencies at each locus using Brookfield's second method (Brookfield, 1996) implemented in the software Microchecker version 2. 2. 3. (Van Oosterhout *et al.*, 2004). We next tested if the observed blank genotype frequencies were smaller than the estimated null homozygote frequencies using a unilateral binomial test (H_1 : the observed frequencies are smaller than expected) computed using the software S-Plus 2000 professional release 2 (MathSoft Inc., Seattle, USA).

The effect of individual host on population structure was tested for each host type, life stage, year and site (see Table 1). To combine independent tests, we used Fisher's (1970) method (see De Meeûs *et al.* 2007 for a precise description of the procedure) across sites and years. As indicated in Table 2, this resulted in eight "global" P -values.

Differentiation between ticks from different host types was assessed using a hierarchical approach using HierFstat 0.04-4 (Goudet, 2007, updated from Goudet, 2005: see also De Meeûs,

Goudet, 2007) where tick infrapopulations (*i.e.*, ticks from the same host individual) are nested within host categories as defined in Table 1. We considered each site sampled in a given year and each tick stage separately, and tested the significance of $F_{HT/T}$, the differentiation among host types within the total, using 1000 permutations of tick infrapopulations between host categories with the G -based test of Goudet *et al.* (Goudet *et al.* 1996). Only four host type pairs could be tested this way: birds vs. roe deer (two tests with nymphs in Chizé and Gardouch); roe deer vs. wild boar (one test with adults in Chizé); birds vs. rodents (one test with larvae in Drienovec 2006) and birds vs. lizards (two tests in Drienovec 2007 with larvae and with nymphs). When two tests were available, P -values were also combined with Fisher's procedure. In order to take into account the variance in genetic diversity (see above), we also estimated the differentiation corrected for polymorphism $F_{HT/T}'$ using Hedrick's method ($F_{HT/T}' = F_{HT/T} / (1 - H_s)$: Hedrick 1999, 2005).

Results

Polymorphism

Nei's (1987) unbiased estimates of heterozygosity were high at all loci ($0.739 \leq H_s \leq 0.896$), except for the roe deer ticks of Gardouch (Table 1).

Two of the 21 possible pairs of loci were in linkage disequilibrium (IRN15a and IR37, P -value=0.037; IRN15b and IR27, P -value=0.010). Nevertheless, this result may be due the effect of multiple testing that enhances the probability of falsely rejecting the null hypothesis. Indeed, these tests were no longer significant after sequential Bonferroni correction (Holm, 1979) and two significant test out of 21 loci pairs is not significantly different from that expected under the null

hypothesis (unilateral binomial test, H1: the proportion of significant tests is greater than 5%, P -value = 0.283).

The level of heterozygote deficiency was high overall loci ($F_{IS}=0.578$, P -value ≤ 0.00007), but was variable across loci (figure 2). This strongly suggests the presence of null alleles at the loci considered as previously reported (De Meeûs *et al.*, 2002; Delaye *et al.*, 1997; Roed *et al.*, 2006). None of the binomial tests for goodness of fit to the expected proportion of blanks was significant (P -value ≥ 0.125) and thus null alleles reasonably explain all heterozygote deficits found in this data set.

Differentiation Among Host Individuals and Host Types

A glance at Table 2 reveals that host individual can have a significant impact on genetic variability apportionment (mean $F_{ST}=0.045$, P -value=0.002) and must be controlled for in the analysis to follow.

Except for the comparison between birds and lizards ($F_{HT/T}=0$), all comparison between host types were significant ($F_{HT/T}>0.013$, P -value ≤ 0.013) (Table 3). These values are substantial given the high degree of polymorphism as can be seen from $F_{HT/T}$ ' values (Table 3)

Discussion

High heterozygote deficiencies were reasonably explained by the presence of null alleles. Null alleles increases variance of estimates and consequently may amplify type II error (i.e., probability of falsely accepting the null hypothesis) of statistical tests. Here we obtained significant tests despite this problem.

We observed a significant effect of host individual in shaping the genetic architecture within populations of *I. ricinus*. Because of their reduced capacity for active dispersal, we can suppose that larvae from the same clutch stay in close proximity after hatching. Sib-larvae may thus have a high probability of exploiting the same host individual. However, we expect that this effect should be diluted over tick stages. First, unfed nymphs and adults have higher mobility and may disperse independently over several meters (Falco, Fish, 1991; Perret *et al.*, 2003). Second, sib-adults and nymphs have a much lower probability of being found close together, unless if fed larvae and nymphs detach synchronously from their hosts after the blood meal. However, the timing of detachment tends to be variable among individual ticks (Eisen, Lane, 2002). As an alternative, we can hypothesize that ticks actively cluster according to their relatedness, and thus that related ticks have a higher probability of exploiting the same host. Interestingly, recent work has shown that related questing adult ticks may effectively be more prone to be found as mating pairs (Kempf *et al.* 2008), suggesting the active aggregation of related ticks on the vegetation.

I. ricinus has been traditionally depicted as a generalist parasite (*e.g.* Perez-Eid, 2007) and tick evolution has been suggested to be driven mainly by environmental constraints rather than interactions with the hosts (Klompen *et al.*, 1996). However, field observations do not always provide reliable observations on the relative use of the different host types, or the potential adaptation of parasites to these hosts (*i.e.*, host specialization; Tripet, Richner, 1997). This is particularly true in ticks, where traditional sampling protocol involves using flagging (*i.e.* dragging a cloth through the vegetation to recover unfed questing ticks). Many ecological traits of ticks may favour host specialization (low dispersal capabilities, high reproductive rates, host-associated mating, and high intimacy with host environment; see Magalhaes *et al.*, 2007) and a recent study have proved that tick specialisation on new hosts can be very fast (De Meeûs *et al.*, submitted). Previous studies have shown thus evidence of host specialization in the related species *Ixodes uriae*, a tick that exploits different species of colonial seabirds (McCoy *et al.*, 2001, 2005). Nevertheless, in *I. uriae*, the different hosts are highly abundant and spatially and temporally

predictable. In this case, for example, the association between host use and mating is largely a by-product of site fidelity of its hosts, which is not *a priori* expected for all *I. ricinus* hosts (but see Wang, Schreiber, 2001) . Here, we observed a significant differentiation among tick populations exploiting different host types within a local area. This divergence suggests a major effect of host-associated selection acting in this system. This selection may be linked to aspects of host physiology, such as the immune system, which can differ greatly among host types (Brossard, Wikel, 2004; Kurtenbach *et al.*, 2002; Magalhaes *et al.*, 2007), and/or to differences in the encounter strategies/habitat associations used by differ tick sub-groups. Transplantation experiments, where ticks of different host-associated sub-groups are exposed to novel vs. original host types, and host preference experiments, would help to distinguish between these alternative hypotheses.

The presence of local host-associated tick groups within *Ixodes ricinus* populations may have considerable consequences for our comprehension of the dynamics of this system and for the epidemiology of the micropathogens transmitted by this tick. For example, different host specialized ticks may be associated with distinct transmission cycles in relation to the maintenance of the local diversity of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* s. l. (Derdáková, Lenčáková, 2005). Indeed, previous observations showed some level of host specificity in the presence of different *Borrelia* species. For example, *B. garinii* and *B. valaisiana* are typically associated with birds, whereas *B. afzelii* and *B. burgdorferi* s. s. are more frequently found in rodents (Derdáková, Lenčáková, 2005). The isolation of these bacterial species may, in part, be explained by constraints imposed by the tick vector. Indeed, this type of vector-induced isolation has been suggested to occur in the marine cycle of Lyme disease (Duneau *et al.* 2008). The degree of vector specialization may therefore have profound consequences for the success of pathogen control strategies (Gooding, 1996). More generally, these results highlight the need to reconsider the role of host driven effects in the evolution of ticks and the consequences of local host associations for epidemiological models of vector borne disease and human disease risk.

Acknowledgements

We thank J. Joachim and N. Cèbe for their help in tick sampling, and F. Cerqueira for her help in data analysis. We also thank the members of the “Ticks and tick-borne diseases” working group of the Réseau Ecologie des Interactions Durables (REID) for useful discussions. This study was financed by a grant from the Agence National de la Recherche (ANR-06-JCJC-0095-01). Florent Kempf is supported by the French Ministry for National Education.

References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004) GENETIX 4. 05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* 5, 453-455.
- Brossard M, Wikel SK (2004) Tick immunobiology. *Parasitology* 129 Suppl, S161-176.
- Cadenas FM, Rais O, Jouda F, *et al.* (2007) Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J. Med. Entomol.* 44, 683-693.
- Casati S, Bernasconi MV, Gern L, Piffaretti JC (2008) Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus sensu stricto* (Acari: Ixodidae). *Infect. Genet. Evol.* 8, 152-158.

- Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E (2008) Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1074-1080.
- De Meeûs T, Beati L, Delaye C, Aeschlimann A, Renaud F (2002) Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 56, 1802-1807.
- De Meeûs T, McCoy KD, Prugnolle F, *et al.* (2007) Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête". *Infect. Genet. Evol.* 7, 308-332.
- De Meeûs T, Goudet J (2007) A step-by-step tutorial to use HierFstat to analyse populations hierarchically structured at multiple levels. *Infect. Genet. Evol.* 7, 731-735.
- De Meeûs T, Humair PF, Grunau C, Delaye C, Renaud F (2004) Non-Mendelian transmission of alleles at microsatellite loci: an example in *Ixodes ricinus*, the vector of Lyme disease. *Int. J. Parasitol.* 34, 943-950.
- De Meeûs T, Koffi BB, Barré N, De Garine-Wichatitsky M, Chevillon C (submitted) Swift sympatric adaptation of a species of cattle tick to a new deer host in New-Caledonia.
- Delaye C, Aeschlimann A, Renaud F, Rosenthal B, De Meeus T (1998) Isolation and characterization of microsatellite markers in the *Ixodes ricinus* complex (Acari: ixodidae). *Mol. Ecol.* 7, 357-363.
- Delaye C, Béati L, Aeschlimann AA, Renaud F, De Meeûs T (1997) Population genetic structure of *Ixodes ricinus* in Switzerland from allozymic data: no evidence of divergence between nearby sites. *Int. J. Parasitol.* 27, 769-773.
- Derdáková M, Lenčáková D (2005) Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann. Agric. Environ. Med.* 12, 165-172.

- Eisen L, Lane RS (2002) Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: *Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control* (eds. Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G). CABI Publishing: Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- Falco RC, Fish D (1991) Horizontal movement of adult *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) attracted to CO₂-baited traps. *J. Med. Entomol.* 28, 726-729.
- Faulde MK, Robbins RG (2008) Tick infestation risk and *Borrelia burgdorferi* s. l. infection-induced increase in host-finding efficacy of female *Ixodes ricinus* under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 44, 137-145.
- Gooding RH (1996) Genetic Variation in Arthropod Vectors of Disease-Causing Organisms: Obstacles and Opportunities. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 301-320.
- Goudet J (2005) Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol. Ecol. Notes* 5, 184-186. .
- Gubler D (1998) Resurgent vector-borne diseases as a global health problem *Emerg. Infect. Dis.* 4, 442-450.
- Hedrick PW (1999). Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53(2): 313-318.
- Hedrick PW (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 59(8): 1633-1638.
- Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6, 65-70.
- Kain DE, Sperling FAH, Daly HV, Lane RS (1999) Mitochondrial DNA sequence variation in *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity* 83, 378-386.

- Kempf F, McCoy KD, De Meeûs T (submitted) Population structure, Wahlund effects and sex biased dispersal in *Ixodes ricinus*, the European vector of Lyme borreliosis: new tools for old data.
- Kempf F, De Meeûs T, Arnathau C, Degeilh B, McCoy KD (2008) Assortative Pairing in *Ixodes ricinus* L. (Acari:Ixodidae), the European Vector of Lyme Borreliosis. *J. Med. Entomol.* in press.
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Oliver Jr. JH (1996) Evolution of ticks. *Ann. Rev. Entomol.* 41, 141-161.
- Koffi BB, de Meeus T, Barre N, *et al.* (2006) Founder effects, inbreeding and effective sizes in the Southern cattle tick: the effect of transmission dynamics and implications for pest management. *Mol. Ecol.* 15, 4603-4611.
- Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, *et al.* (2002) Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. *Trends Microbiol.* 10, 74-79.
- Magalhaes S, Forbes MR, Skoracka A, *et al.* (2007) Host race formation in the Acari. *Exp. Appl. Acarol.* 42, 225-238.
- McCoy KD (2008) The Population Genetic Structure of Vectors and our Understanding of Disease Epidemiology. *Parasite* 15, 444-448.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, Michalakis Y (2001) Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *J. Evol. Biol.* 14, 395-405.
- McCoy KD, Chapuis E, Tirard C, *et al.* (2005) Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proc. Biol. Sci B* 272, 2389-2395.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press, New York.

- Parola P, Raoult D (2001) Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 80-83.
- Paulauskas A, Radzijeuskaja J, Rosef O, *et al.* (2006) Genetic variation of ticks (*Ixodes ricinus* L.) in the Lithuanian and Norwegian populations *Exp. Appl. Acarol.* 40, 259-270.
- Perez-Eid C (2007). Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Tec & Doc (Lavoisier): Paris, France.
- Perret JL, Guerin PM, Diehl PA, Vlimant M, Gern L (2003) Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J. Exp. Biol.* 206, 1809-1815.
- Pichon B, Kahl O, Hammer B, Gray JS (2006) Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 382-387.
- Rich SM, Caporale DA, Telford III SR, *et al.* (1995) Distribution of the *Ixodes ricinus*-like ticks of eastern North America *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6284-6288.
- Roed KH, Hasle G, Midthjell V, Skretting G, Leinaas HP (2006) Identification and characterization of 17 microsatellite primers for the tick, *Ixodes ricinus*, using enriched genomic libraries. *Mol. Ecol. Notes* 6, 1165-1167.
- Sonenshine DE (1993). Biology of ticks., Vol 2. Oxford University Press: Oxford, United Kingdom.
- Stańczak J, Mohammed Gabre R, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B (2004) *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11, 109-114.
- Tripet F, Richner H (1997) The coevolutionary potential of a 'generalist' parasite, the hen flea *Ceratophyllus gallinae*. *Parasitology* 115, 419-427.

- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535-538.
- Wang M, Schreiber A (2001). The impact of habitat fragmentation and social structure on the population genetics of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in Central Europe. *Heredity* 86(Pt 6): 703-715.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 38, 1358-1370.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 19, 395-420.

Figures

Figure 1

Sampling locations of the studied *I. ricinus* populations. See Table 1 for sample sizes and host types.

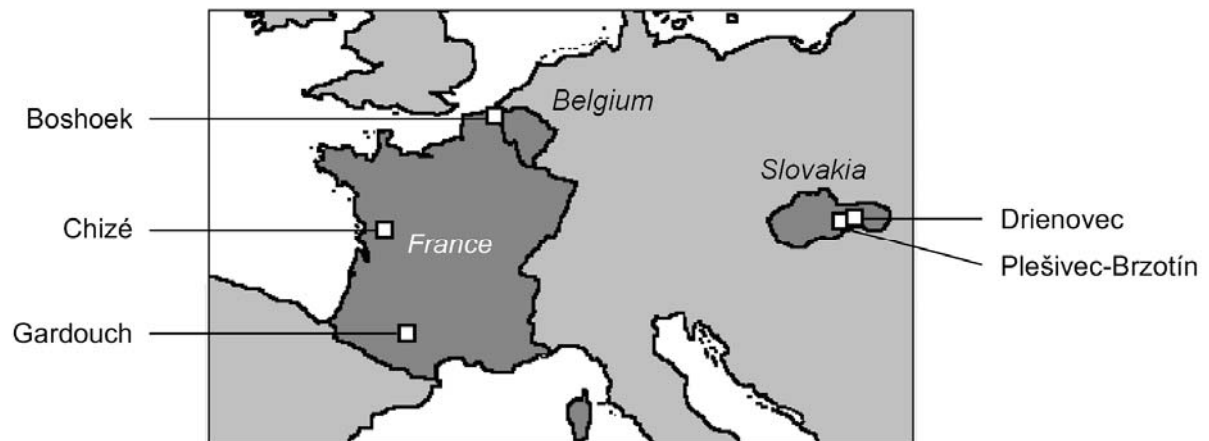


Figure 2

Heterozygote deficiencies estimated using Weir & Cockerham's (1984) method, at each locus (confidence intervals calculated by jackknifing over populations) and for all loci (confidence intervals calculated by bootstrapping over loci: 1000 bootstraps).

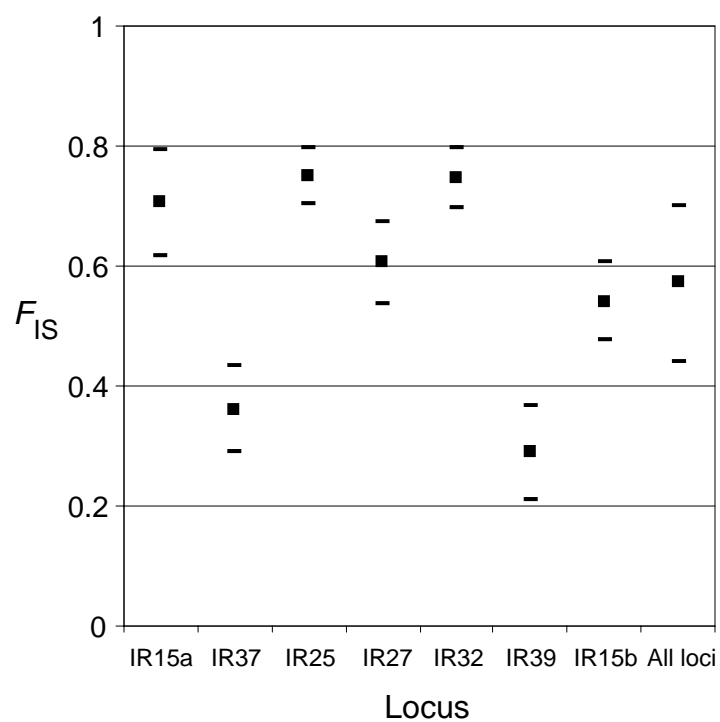


Table 1: Number of ticks (“Ticks”) for each population, defined by its sampling site, year, host type, and life stage. For each population, we report the values of Nei’s (1987) unbiased index of genetic diversity H_s and Weir & Cockerham’s (1984) estimator of F_{IS} ; NC means that the data were too scarce to allow computations (*i.e.*, incomplete genotypes and/or too few individuals). “Hosts” refers to the number of sampled host individuals.

Site	Host type	Year	Stage	Ticks	Hosts	H_s	F_{IS}
Boshoek	Rodent	2006	Larva	35	21	0.782	0.708
			Nymph	2	1	NC	NC
Chizé	Bird	2007	Larva	18	5	0.835	0.437
			Nymph	12	3	0.690	0.550
	Roe Deer	2007	Nymph	12	5	0.743	0.657
			Adult	40	30	0.711	0.521
	Wild Boar	2007	Adult	28	13	0.735	0.666
Gardouch	Bird	2007	Larva	69	30	0.862	0.689
			Nymph	15	9	0.672	0.579
	Roe Deer	2007	Larva	1	1	NC	NC
			Nymph	13	10	0.587	0.57
			Adult	22	16	0.551	0.589
Drienovec	Bird	2002	Larva	20	5	0.902	0.562
			Nymph	7	3	0.920	0.390
	Bird	2006	Larva	31	13	0.829	0.647
			Nymph	23	8	0.763	0.688
	Bird	2007	Larva	24	3	0.773	0.592
			Nymph	11	3	0.805	0.763
	Lizard	2007	Larva	26	3	0.753	0.443
			Nymph	24	3	0.831	0.495
	Rodent	2006	Larva	35	10	0.836	0.587
			Nymph	1	1	NC	NC
Plešivec-Brzotín	Bird	2002	Larva	12	6	0.802	0.688
			Nymph	21	7	0.690	0.468
	Bird	2003	Larva	33	3	0.719	0.551
			Nymph	23	2	0.825	0.500
	Lizard	2004	Larva	15	3	0.753	0.446
			Nymph	25	3	0.761	0.495

Table 2: Average differentiation (F_{ST}) of ticks among different host individuals within each population defined by stage and host type. We used Fisher's procedure to summarize independent tests across different geographic sites, and years. Significant tests are in bold.

Host type	Ticks' stage	Number of tests combined	F_{ST} (unweighted mean)	P -value (Fisher)
Bird	Larva	7	0.032	0.075
	Nymph	7	-0.003	0.468
Lizard	Larva	2	0.049	0.108
	Nymph	2	0.023	0.072
Roe deer	Nymph	2	0.149	0.013
	Adult	2	0.070	0.020
Wild boar	Adult	1	0.043	0.182
Rodent	Larva	2	0	0.520
All (Fisher)		8	0.045	0.002

Table 3: Differentiation of ticks among host types $F_{HT/T}$, estimated with HierFstat and tested by permuting host individuals among host types (1000 permutations: see Material and Methods). When possible tests were combined using Fisher's procedure. We reported here the unweighted mean $F_{HT/T}$, its combined P -value, the mean genetic diversity H_s , the differentiation corrected for polymorphism $F_{HT/T}'$. Significant tests are in bold (see Material and Methods).

Host types		No.	Stage	Year	Site	$F_{HT/T}$	P -value	H_s	$F_{HT/T}'$
tests									
Bird	Roe Deer	2	Nymph	2007	Chizé/ Gardouch	0.040	0.014	0.681	0.125
Roe Deer	Wild Boar	1	Adult	2007	Chizé	0.032	0.002	0.745	0.125
Bird	Rodent	1	Larva	2006	Drienovec	0.013	0.003	0.831	0.077
Bird	Lizard	2	Larva/ Nymph	2007	Drienovec	-0.004	0.438	0.796	-0.020

5.4. Bilan: la complexité du modèle *Ixodes ricinus*

Nous avons pu mettre en évidence l'appariement assorti, de manière très nette, dans deux des quatre sites étudiés. De plus, le fait de ne pas avoir observé d'appariement assorti dans deux autres sites nuance quelque peu ces résultats. De façon cohérente avec l'hypothèse de l'existence de races d'hôte, nous ne pouvons qu'émettre l'hypothèse que, dans ces deux derniers sites, nous avons chaque fois échantillonné des tiques appartenant à une seule et même race d'hôte – donc en pangamie.

Nous avons mis en évidence l'existence d'une sous-structuration importante dans les populations d'*Ixodes ricinus*. Nous avons confirmé par ailleurs l'existence du biais de dispersion sexe-spécifique chez *I. ricinus* (i.e. les mâles dispersent davantage) auquel semble se superposer un biais de survie larvaire sexe spécifique: les fratries de mâles auraient une probabilité de survie beaucoup plus variable que les femelles.

Nous avons pu enfin mettre évidence un effet significatif des infrapopulations et du type d'hôte dans la distribution de l'information génétique au sein des populations de cette tique.

Ces études posent donc une base solide pour étudier les aspects de la spécialisation chez cette espèce, la généralité de la spécialisation dans le complexe d'espèces *I. ricinus*, et ses conséquences pour l'épidémiologie des pathogènes associés.

6. Discussion générale:
structure génétique et évolution de la
spécialisation chez *I. uriae* et *I. ricinus*

6. Structure génétique et évolution de la spécialisation chez *I. uriae* et *I. ricinus*

Une première approche de la spécialisation chez *I. uriae* a permis de confirmer l'existence d'une structuration de l'information génétique entre différentes espèces hôtes, aux différents marqueurs microsatellites considérés. Pour étudier plus avant ce processus, nous avons tenté d'élucider l'histoire de ces races d'hôtes à l'aide d'un marqueur mitochondrial à évolution plus lente. Les résultats obtenus vont dans le sens inverse obtenus avec les marqueurs microsatellites: dans le premier, nous avons vu que ce sont les hôtes qui structuraient l'information génétique à ces marqueurs. Cette différence entre ADN_{mt} et ADN_n pourrait s'interpréter en terme de biais de dispersion sexe-spécifique (à cause du mode de transmission uniparental de l'ADN_{mt}) ou de vitesse d'évolution différente. Les singularités du génome mitochondrial plaident pour la seconde hypothèse : celui-ci se distingue par des taux de mutation plus faibles, un effectif efficace plus réduit, une absence de recombinaison (Ballard, Whitlock, 2004), et la formation de sa diversité semble en partie contrôlée les phénomènes sélectifs (Bazin *et al*, 2006).

Les effets «individu hôte» et «type d'hôte» sont significativement importants dans la structuration génétique des populations de tiques. Ainsi, malgré sa stratégie de rencontre en apparence opportuniste, il faut admettre le choix des hôtes n'est pas aléatoire chez *I. ricinus*. De façon similaire à *I. uriae*, et malgré les limitations de notre jeu de données (allèles nuls, nombreuses années d'échantillonnage), il est probable qu'il s'agisse de races d'hôtes.

Dans un site où plusieurs types d'hôtes et plusieurs races cohabiteraient, les races se maintiendraient par appariement assorti. Les mécanismes proximaux de la rencontre des apparentés peuvent se déduire de la littérature: *I. ricinus* peut copuler aussi bien sur l'hôte que sur la végétation (dans les conditions où nous l'avons échantillonné). L'agrégation hors de l'hôte met en jeu des phéromones sexuelles (Kiszewski *et al*, 2001) qui résulte dans une agrégation des tiques, et plus particulièrement une occurrence de couples isolés plus forte qu'attendu dans le cas d'une agrégation indépendante du sexe (Healy et Bourke, 2004). Pour surmonter cette condition supplémentaire à la rencontre des partenaires – la faible mobilité des tiques étant en soi un obstacle – il faut admettre des ordres de grandeur de dispersion raisonnables chez les tiques adultes non-nourries. En conditions de laboratoire, Perret *et al*. (2003) ont ainsi mis en évidence des mouvements linéaires de quelques mètres. Conformément aux attendus théoriques, on peut supposer également que la spécialisation chez *I. ricinus* implique une bonne prédictibilité de la

ressource hôte pour les tiques: une ressource peu abondante et irrégulière compliquerait encore la rencontre des hôtes par les tiques.

L'existence d'un biais de dispersion sexe-spécifique est également surprenante, en regard de la faible probabilité *a priori* de rencontre d'hôtes chez *I. ricinus* que suggère une stratégie d'embuscade aléatoire et une mobilité réduite. Du point de vue proximal, la dispersion sexe-spécifique ne semble pouvoir être interprétée que par une plus forte exploitation d'hôtes plus dispersants par les tiques mâles (i.e., oiseaux). L'émergence et le maintien de tels mécanismes sont prévus par différents modèles évolutifs. Chez les espèces polygynes, comme *I. ricinus* (Kiszewski *et al*, 2001), la plus forte dispersion des mâles permet d'une part l'évitement des conspécifiques du même sexe, ce qui permet la relaxation de la compétition pour les ressources et partenaires sexuels, et/ou d'autre part l'évitement des deux sexes pour limiter la consanguinité (Favre *et al*, 1997; Prugnolle et De Meeûs, 2002). En contrepartie, cette réduction du spectre d'hôtes limite leur probabilité de rencontre: de plus, le survie de la dispersion longue distance est plus aléatoire, en particulier si l'on considère les exigences d'*I. ricinus* et *I. uriae* en termes de conditions micro-environnementales. Ce compromis serait, chez *I. ricinus*, favorable à la dispersion sexe-spécifique, et les effets sur la probabilité de rencontre des hôtes ne compromettent pas le maintien de ce biais de dispersion.

D'une manière générale, les deux espèces de tiques présentent donc des schémas d'adaptation aux hôtes convergents. Dans les deux cas la spécialisation sur l'hôte, avérée chez *I. uriae* et fortement soupçonnée chez *I. ricinus*, représente un phénomène récurrent et récent qui intervient de façon plus ou moins indépendante d'un site à l'autre, en fonction des caractéristiques de l'environnement local. Ceci est vraisemblablement favorisé par un certain degré d'isolement entre différentes populations de ces tiques. Cet isolement, relativement bien documenté pour *I. uriae* entre différentes colonies reste à démontrer formellement pour *I. ricinus* pour laquelle les échantillonnages appropriés s'avèrent délicats. Cependant, un test d'isolement par la distance entre sites Suisses sur les données corrigées pour l'effet *cluster* (voir le chapitre 5.2.), en ne gardant qu'un représentant de chaque sexe par cluster défini par BAPS 5.1., suggère que la dispersion entre sites est beaucoup plus retreinte que ce que l'on pensait auparavant (Figure 6).

Dans les deux cas, l'adaptation aux différents hôtes disponibles va fortement perturber les chemins épidémiologiques que les modèles simples de transmission prévoyaient. Cela est d'autant plus pertinent sur la scène Européenne où la diversité des pathogènes transmis par les deux tiques, en particulier les différentes espèces du complexe *B. burgdorferi s.l.*, pourrait être fortement corrélée aux espèces réservoirs disponibles, comme cela a été montré dans pour la tique *I. scapularis* en Amérique du Nord (Ostfeld et Keesing, 2000). La diversification des vecteurs

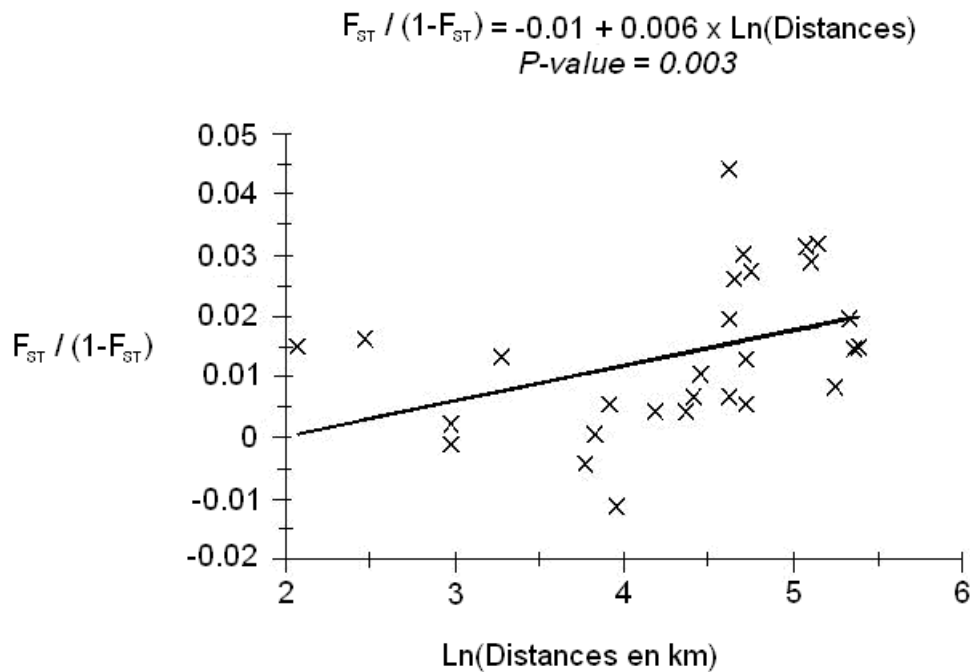


Figure 6 Représentation de l'isolement par la distance entre sites Suisses pour *Ixodes ricinus* (tiques récoltées en 1996) en ne gardant qu'un ou deux individus des clusters définis par BAPS 5.1. dans chaque site.

est ainsi susceptible d'affecter l'épidémiologie des pathogènes associés au niveau (1) de l'étendue de leur spectre d'hôtes (2) de leur probabilité de transmission vers les différents hôtes, et par conséquent, de leur prévalence dans les populations naturelles (Power et Flecker, 2008).

Considérons le premier de ces deux aspects: le scénario couramment admis pour expliquer les patrons de diversité de *B. burgdorferi* s.l., et sa distribution entre les différents hôtes, est l'existence d'une immunité innée des hôtes (i.e., complexe protéique du complément ; Kurtenbach *et al*, 2002). Néanmoins, il n'explique pas tous les cas de figures rencontrés. Par exemple, le sérum des lézards et des oiseaux sont létaux pour *Borrelia lusitaniae*, en condition de laboratoire, alors qu'ils sont considérés comme les réservoirs naturels de cette borrelie (Gern, 2008). La spécialisation d'*I. ricinus* permet d'avancer une hypothèse alternative: la distribution des borrelies entre les hôtes, et le maintien de cette diversité bactérienne résulteraient – au moins en partie – de voies de transmission indépendantes impliquant les différentes races d'hôtes, types d'hôtes et espèces bactériennes. De plus, l'interaction entre les tiques et la Borrelie (voir partie 2.) suggère que les races d'hôtes d'*I. ricinus* pourraient avoir également favorisé l'émergence d'une telle diversité, par un mécanisme de spécialisation «en cascade» (Stireman *et al*, 2006) (i.e., un vecteur spécialiste favorise l'isolement et l'association de certains génotypes de pathogènes avec l'hôte, donc *in fine* sa spécialisation). Les effets du sexe d'*I. ricinus* sur la distribution de *B. burgdorferi*

s.l. (De Meeûs *et al*, 2004b) montrent ainsi combien les préférences d'hôtes du vecteur (i.e. ici, des mâles pour les oiseaux) peut conditionner la distribution des pathogènes.

Ainsi, il a été avancé que la biodiversité des hôtes était susceptible de limiter l'abondance des borrélioses en populations naturelles (Schmidt et Ostfeld, 2001). En effet, une forte richesse spécifique en hôte implique la présence de bons et de mauvais réservoirs pour le pathogène qui entraînerait une diminution du succès de la transmission. On parle ainsi d'«effet de dilution» de la diversité des hôtes sur la prévalence des borrélioses. Or les développements postérieurs de ce modèle ont montré que la présence de vecteurs spécialisés sur les hôtes pouvait fortement moduler cette conclusion (Keesing *et al*, 2006). De façon générale, les résultats de cette thèse s'appliquent donc à l'étude de l'épidémiologie des maladies transmises par les tiques : les événements de spécialisation locaux des tiques, et leur récurrence dans l'histoire des tiques, pourraient affecter la prévalence de ces pathogènes, la dynamique de leur populations dans le temps et dans l'espace.

7. Perspectives de recherche

De nombreuses interrogations ont surgies durant ce travail de thèse et ont parfois été évoquées dans les chapitres précédents. Nous résumerons ici quelques pistes de réflexions :

- Notre connaissance de la phylogéographie d'*I. uriae* demeure limitée au terme de cette étude, et pourrait être étendue à davantage de colonies d'oiseaux plurispécifiques afin d'élucider les rapports entre ces races d'hôtes au sein de cette aire d'échantillonnage. La compréhension des patrons de variation génétique observés, initialement recherchée à l'aide d'un marqueur mitochondrial, passe également par l'élargissement d'une telle étude à des marqueurs nucléaires (Hare, 2001).

- Comment circulent les borrélioses à longue distance? Il a été suggéré qu'*I. uriae* était impliquée dans sa circulation transhémisphérique (Olsen *et al*, 1995). Quelles espèces de borréliose et quelles espèces hôtes sont impliquées dans ces transports? Il s'agirait ici de tester la congruence de la variation génétique des borrélioses et des tiques, en utilisant différents marqueurs pour les tiques et les borrélioses. Ces travaux seraient un approfondissement de ceux entrepris par Duneau *et al*. (2008).

- Il est possible de pratiquer l'élevage de tiques en conditions de laboratoire (au moins pour *I. ricinus*, voir Cotté *et al*, 2008). Peut-on mettre en évidence expérimentalement l'attractivité des différents hôtes chez différentes races de tiques? Peut-on observer des différences comportementales chez les tiques infectées et non infectées par telle ou telle autre espèce de borrélioses? Il a en effet été suggéré une attractivité plus grande des tiques infectées par *B. afzelii* pour les hôtes les plus appropriés à cette borréliose (petits rongeurs) (De Meeûs *et al*, 2004a). Par ailleurs, selon Faulde et Robbins (2008) les femelles tiques infectées par *Borrelia burgdorferi* s.l. trouveraient leurs hôtes plus efficacement. Une étude similaire (attractivité pour les hôtes et effet comportemental de l'infection) pourrait être entreprise chez *I. uriae*.

- A l'échelle intraspécifique, la phylogéographie des tiques n'a pas été abondamment étudiée (e.g., Casati *et al*, 2008; Kain *et al*, 1999), et l'espèce *I. ricinus* est encore moins connue qu'*I. uriae* (voir partie 4) malgré son rôle majeur de vecteur de *B. burgdorferi*. L'existence de marqueurs adéquats utilisés en routine dans une autre étude (Casati *et al*, 2008), dont le panel pourra être élargi à l'avenir lorsque le séquençage en cours du génôme d'*I. scapularis* (espèce appartenant au complexe *I. ricinus*) aura été achevé, rend possible une étude phylogéographique plus approfondie.

- Quel(s) stade(s) sont impliqués dans la dispersion sexe-spécifique ? Répondre à cette question serait rendu possible par la mise au point de marqueurs sexe-spécifiques, toujours sur la base de l'obtention prochaine du génôme complet d'*I. scapularis*. Peut-on mettre en évidence un

biais d'exploitation sexe-spécifique des différents hôtes (i.e. les mâles préférant a priori les oiseaux, et les femelles les hôtes moins dispersants comme les rongeurs)?

- Quelle est la généralité de la spécialisation chez *I. ricinus* (i.e. dans d'autres sites d'échantillonnage)? Dans le complexe d'espèces *I. ricinus*? Dans quelle mesure cette spécialisation varie-t-elle selon la composition de la communauté d'hôte?

- A long terme, la compréhension du système *I. ricinus* impliquerait aussi l'étude expérimentale des capacités vectorielles des tiques pour les différentes espèces de borrélioses, selon le sexe ou la race d'hôte éventuelle de cette tique.

- Olsen et al. (1995) ont suggéré l'importance d'*I. uriae* pour la circulation de *B. burgdorferi* s.l. à l'échelle du globe. Quelles sont les relations génétiques des borrélioses infectant *I. uriae* et les autres membres du complexe *I. ricinus*? Représentent-elles les événements de passage des borrélioses d'une zone continentale à l'autre (i.e. y-a-t-il congruence avec phylogénie et géographie)? Quelle est la fréquence de ces échanges et leurs directions privilégiées éventuelles (i.e., dérivent-elles majoritairement des haplotypes de borrélioses issus d'une même espèce de tique?)

8. Références bibliographiques

- Aeschlimann A (1972). *Ixodes ricinus*, Linné, 1758 (Ixodoidea; Ixodidae) Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. *Acta Trop* **29**: 321-340.
- Aeschlimann A (1981). The role of hosts and environment in the natural dissemination of ticks. Studies on a Swiss population of *Ixodes ricinus* L., 1758. *Rev Adv Parasitol Warszawa* **4**: 859-869.
- Anderson BE, Neuman MA (1997). *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* **10**(2): 203-219.
- Alekseev AN, Dubinina HV, Semenov AV, Bolshakov CV (2001). Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari : Ixodidae) collected from migratory birds. *Journal of Medical Entomology* **38**(4): 471-474.
- Alekseev AN, Jensen PM, Dubinina HV, Smirnova LA, Makrouchina NA, Zharkov SD (2000). Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina : Ixodidae) determined by different methods. *Folia Parasitologica* **47**(2): 147-153.
- Aristote (-335/-323). Ethique à Nicomaque, 2004 Flammarion: Paris, France, 560 p.
- Awise JC (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann Rev Ecol Syst* **18**: 489-522.
- Barbour AG, Fish D (1993). The biological and social phenomenon of Lyme disease. *Science* **260**: 1610 - 1616.
- Barker SC, Murrell A (2002). Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Exp Appl Acarol* (28): 55-68.
- Barton TR, Harris MP, Wanless S, Elston DA (1996). The activity periods and life cycle of the tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) in relation to host breeding strategies. *Parasitology* **112**: 571-580.
- Bazin E, Glémin S, Galtier N (2006). Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals. *Science* **312**: 570-572.
- Benoit JB (2007). Habitat requirements of the seabird tick, *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae), from the Antarctic Peninsula in relation to water balance characteristics of eggs, nonfed and engorged stages. *J Comp Physiol B* **177**(205-215).
- Blondel J (1995). Biogéographie - Approche écologique et évolutive. Masson: Paris, France, 297p.
- Boulinier T, Danchin E (1996). Population trends in Kittiwake *Rissa tridactyla* colonies in relation to tick infestation. *Ibis* **138**: 326-334.
- Brossard M, Wikel SK (2004). Tick immunobiology. *Parasitology* **129 Suppl**: S161-176.
- Camicas J-L (1998). Les tiques du monde (Acarida, Ixodida) : nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (espèces décrites avant le 1/01/96)e. Editions de l'Orstom: Paris, France, 233 p.

- Casati S, Bernasconi MV, Gern L, Piffaretti JC (2008). Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus sensu stricto* (Acari: Ixodidae). *Infect Genet Evol* **8**(2): 152-158.
- Clayton DH, Al-Tamimi S, Johnson KP (2003). The ecological basis of coevolutionary history. Dans: Page RDM (éditeur) Tangled trees : phylogeny, cospeciation, and coevolution. University of Chicago Press: Chicago, E.-U., 350 p.
- Chastel C (1988). Tick-borne virus infections of marine birds. Dans: Harris KF (éditeur) Advances in disease vector research. Springer-Verlag: New York, E.-U., pp 25-60.
- Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schafer SM, Vitorino L *et al* (2004). First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* **42**(3): 1316-1318.
- Combes C (1995). Interactions durables: écologie et évolution du parasitisme. Masson: Paris, France, 524p.
- Combes C, Théron A (2000). Metazoan parasites and resource heterogeneity: constraints and benefits. *Int J Parasitol* **20**: 299-304.
- Corander J, Waldmann P, Marttinen P, Sillanpää MJ (2004). BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* **20**(15): 2363-2369.
- Corander J, Marttinen P, Mantyniemi S (2006). A Bayesian method for identification of stock mixtures from molecular marker data. *Fish Bull* **104**(4): 550-558.
- Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E (2008). Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* **14**(7): 1074-1080.
- Coulson JC, Nève de Mévergnies G (1992). Where do young kittiwakes *Rissa tridactyla* breed, philopatry or dispersal? *Ardea* **80**: 187-197.
- Couvreux B, Beaufays J, Charon C, Lahaye K, Gensale F, Denis V *et al* (2008). Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One* **3**(1): e1400.
- Crooks E, Randolph SE (2006). Walking by *Ixodes ricinus* ticks: intrinsic and extrinsic factors determine the attraction of moisture or host odour. *J Exp Biol* **209**(Pt 11): 2138-2142.
- Danchin E (1992). The incidence of the tick parasite *Ixodes uriae* in kittiwake *Rissa tridactyla* colonies in relation to the age of the colony and the mechanism of infecting new colonies. *Ibis* **134**: 134-141.
- Danielova V, Rudenko N, Daniel M, Holubova J, Materna J, Golovchenko M *et al* (2006). Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* **296 Suppl 40**: 48-53.
- Darwin CR (1859). *L'origine des espèces*, 1999 edn. Flammarion: Paris, 608 p.

- Davidson MM, Williams H, Macleod JAJ (1991). Louping Ill in Man - a Forgotten Disease. *J Infect* **23**(3): 241-249.
- Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sanchez JL, Goldsmith CS, Wilson KH *et al* (1991). Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* **29**(12): 2741-2745
- De Meeûs T, Beati L, Delaye C, Aeschlimann A, Renaud F (2002). Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. *Evolution* **56**(9): 1802-1807.
- De Meeûs T, Goudet J (2000). Adaptive diversity in heterogeneous environments for populations regulated by a mixture of soft and hard selection. *Evol Ecol Res* **2**: 981-995.
- De Meeûs T, Humair PF, Grunau C, Delaye C, Renaud F (2004a). Non-Mendelian transmission of alleles at microsatellite loci: an example in *Ixodes ricinus*, the vector of Lyme disease. *Int J Parasitol* **34**(8): 943-950.
- De Meeûs T, Lorimier Y, Renaud F (2004b). Lyme borreliosis agents and the genetics and sex of their vector, *Ixodes ricinus*. *Microbes Infect* **6**(3): 299-304.
- De Meeûs T, Michalakis Y, Renaud F (1998). Santa Rosalia revisited: or why are there so many kinds of parasites in 'The Garden of Earthly Delights'? *Parasitol Today* **14**(1): 10-13.
- Derdáková M, Lenčáková D (2005). Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann Agric Environ Med* **12**(2): 165-172.
- Dolan MC, Piesman J, Mbow ML, Maupin GO, Peter O, Brossard M *et al.* (1998). Vector competence of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for three genospecies of *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* **35**(4): 465-470.
- Duffy DC (1983). The Ecology of Tick Parasitism on Densely Nesting Peruvian Seabirds. *Ecology* **64**(1): 110-119.
- Duneau D, Boulonier T, Gomez-Diaz E, Petersen A, Tveraa T, Barrett RT *et al* (2008). Prevalence and diversity of Lyme borreliosis bacteria in marine birds. *Infect Genet Evol* **8**(3): 352-359.
- Eisen L, Lane RS (2002). Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Dans: Gray J, Kahl O, Lane RS and Stanek G (éditeurs) Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing: Wallingford, Oxon, Royaume-Uni.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas J-L, Walker AR (2004). Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. Saragosse: Université de Saragosse, Espagne, 131 p.
- Eveleigh ES, Threlfall W (1974). The biology of *Ixodes (Ceratixodes) uriae* White, 1852 in Newfoundland. *Acarologia* **16**: 621-635.
- Falco RC, Fish D (1991). Horizontal movement of adult *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) attracted to CO₂-baited traps. *J Med Entomol* **28**(5): 726-729.

- Faulde MK, Robbins RG (2008). Tick infestation risk and *Borrelia burgdorferi* s.l. infection-induced increase in host-finding efficacy of female *Ixodes ricinus* under natural conditions. *Exp Appl Acarol* **44**(2): 137-145.
- Favre L, Balloux F, Goudet J, Perrin N (1997). Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocodylus russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. *Proc Roy Soc B* **264**: 127-132.
- Fikrig E, Narasimhan S (2006). *Borrelia burgdorferi*-traveling incognito? *Microbes Infect* **8**(5): 1390-1399.
- Filchak KE, Roethele JB, Feder JL (2000). Natural selection and sympatric divergence in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *Nature* **407**: 739-742.
- Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D (2000). Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis* **6**(4): 389-392.
- Fukunaga M, Yabuki M, Hamase A, Oliver Jr. JH, Nakao M (2000). Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, Internal transcribed spacer 2, sequences. *J Parasitol* **86**(1): 38-43.
- Gandon S, Capowiez Y, Dubois Y, Michalakakis Y, Olivieri I (1996). Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society of London, B* **263**: 1003-1009.
- Gern L, Humair PF (2002). Ecology of *B. burgdorferi* in Europe. Dans: Gray J, Kahl O, Lane RS and Stanek G (éditeurs) *Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control*. CABI Publishing: Wallingford, Oxon, Royaume-Uni.
- Gern L (2008). *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. *Parasite* **15**: 244-247.
- Gingerich PD (2001). Rates of evolution on the time scale of the evolutionary process. *Genetica* **112-113**: 127-144.
- Gooding RH (1996). Genetic variation in arthropod vectors of disease-causing organisms: obstacles and opportunities. *Clin Microbiol Rev* **9**(3): 301-320.
- Grenacher S, Krober T, Guerin PM, Vlimant M (2001). Behavioural and chemoreceptor cell responses of the tick, *Ixodes ricinus*, to its own faeces and faecal constituents. *Exp Appl Acarol* **25**(8): 641-660.
- Gubler DJ (1998). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* **4**(3): 442-450.
- Guiguen C (1988). Anthropozoonoses et oiseaux marins: contribution à l'étude des ectoparasites hématophages des espèces nicheuses sur les côtes françaises continentales et insulaires. Thèse de doctorat, Faculté de Médecine de Marseille, France.
- Gylfe Å, Olsen B, Strasevicius D, Marti Ras N, Weihe P, Noppa L *et al* (1999). Isolation of Lyme disease *Borrelia* from puffins (*Fratercula arctica*) and seabird ticks (*Ixodes uriae*) on the Faeroe Islands. *J Clin Microbiol* **37**(4): 890-896.

- Gylfe Å, Yabuki M, Drotz M, Bergström S, Fukunaga M, Olsen B (2001). Phylogeographic relationships of *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) and their significance to transequatorial dispersal of *Borrelia garinii*. *Hereditas* **134**(3): 195-199.
- Hafner MS, Page RDM (1995). Molecular phylogenies and host-parasite cospeciation: gophers and lice as a model system. *Philos Trans Roy Soc Lond B* **349**:: 77-83.
- Hairston NG, Ellner SP, Geber MA, Yoshida T, Fox JA (2005). Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecol Lett* **8**(10): 1114-1127.
- Hanincova K, Taragelova V, Koci J, Schafer SM, Hails R, Ullmann AJ *et al.* (2003). Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *App Env Microbiol* **69**(5): 2825-2830.
- Hare PM (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends Ecol Evol* **16**(12): 700-706.
- Healy JA, Bourke P (2008). Aggregation in the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae): use and reuse of questing vantage points. *J Med Entomol* **45**(2): 222-228.
- Healy JAE, Bourke P (2004). Field evidence for aggregating behaviour in the tick *Ixodes ricinus* L. *Acarologia* **44**:: 3-14.
- Hudson PJ, Norman R, Laurenson MK, Newborn D, Gaunt M, Jones L *et al.* (1995). Persistence and transmission of tick-borne viruses: *Ixodes ricinus* and louping-ill virus in red grouse populations. *Parasitology* **111**: S49-S58.
- Kain DE, Sperling FAH, Daly HV, Lane RS (1999). Mitochondrial DNA sequence variation in *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity* **83**: 378-386.
- Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* **9**: 485-489.
- Kempf F, De Meeûs T, Arnathau C, Degeilh B, McCoy KD (2008). Assortative Pairing in *Ixodes ricinus* L. (Acari:Ixodidae), the European Vector of Lyme Borreliosis. *J Med Entomol*, sous presse.
- Kirkpatrick M, Ravigné V (2002). Speciation by Natural and Sexual Selection Models and Experiments. *Am Nat* **159**: S22-S35.
- Kiszewski AE, Matuschka F-R, Spielman A (2001). Mating strategies and spermiogenesis in Ixodid ticks. *Ann Rev Entomol* **46**: 167-182.
- Klompen JSH, Black WC, Keirans JE, Oliver JH (1996). Evolution of ticks. *Annu Rev Entomol* **41**: 141-161.
- Klompen JSH, Lekveishvili M, Black IV WC (2007). Phylogeny of parasitiform mites (Acari) based on rRNA. *Mol Phylogenet Evol* **43**(3): 936-951.
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Norris DE (2000). Systematics and Biogeography of Hard Ticks, a Total Evidence Approach. *Cladistics* (**16**): 79-102.

- Krasnov BR, Sarfati M, Arakelyan MS, Khokhlova IS, Burdelova NV, Degen AA (2003). Host specificity and foraging efficiency in blood-sucking parasite: feeding patterns of the flea *Parapulex chephrenis* on two species of desert rodents. *Parasitol Res* **90**(5): 393-399.
- Kurtenbach K, DeMichelis S, Etti S, Schäfer SM, Sewell H-S, Brade V *et al* (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. *Trends in Microbiology* **10**(2): 74-79.
- Lees AD, Milne A (1951). The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus* L.). *Parasitology* **41**: 189-208.
- Lefcort H, Durden LA (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* **113** (Pt 2): 97-103.
- Lindgren E, Talleklint L, Polfeldt T (2000). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect* **108**(2): 119-123.
- Magalhaes S, Forbes MR, Skoracka A, Osakabe M, Chevillon C, McCoy KD (2007). Host race formation in the Acari. *Exp App Acarol* **42**(4): 225-238.
- Mans BJ, Neitz AW (2004). Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol* **34**(1): 1-17.
- McCoy KD (2001). Conséquences de la dispersion dans les systèmes hôtes-parasites: dynamique des populations, structure génétique, et adaptation locale chez un parasite d'oiseaux marins, la tique *Ixodes uriae*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, France.
- McCoy KD (2003). Sympatric speciation in parasites - what is sympatry? *Trends Parasitol* **19**(9): 400-404.
- McCoy KD (2008). The Population Genetic Structure of Vectors and our Understanding of Disease Epidemiology. *Parasite* **15**(3): 444-448.
- McCoy KD, Boulinier T, Schjørring S, Michalakis Y (2002). Local adaptation of the ectoparasite *Ixodes uriae* to its seabird host. *Evolutionary Ecology Research* **4**: 441-456.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, Michalakis Y (2003). Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution* **57**(2): 288-296.
- McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, Michalakis Y (2001). Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 395-405.
- McCoy KD, Chapuis E, Tirard C, Boulinier T, Michalakis Y, Le Bohec C *et al* (2005). Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proc R Soc Lond B* **272**(1579): 2389-2395.

- McCoy KD, Tirard C (2002). Reproductive strategies of the seabird tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae). *J Parasitol* **88**(4): 813-816.
- Mejlon H, Jaenson TGT (1997). Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* **21**(1997): 747-754.
- Muzaffar SB, Jones IL (2007). Activity periods and questing behavior of the seabird tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) on Gull Island, Newfoundland: the role of Puffin chicks. *J Parasitol* **93**(2): 258-264.
- Nieberding C, Morand S, Libois R, Michaux JR (2004). A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proc Roy Soc Lond B* **271**(1557): 2559-2568.
- Nilsson A, Lundqvist (1978). Host selection and movements of *Ixodes ricinus* (Acari) larvae on small mammals. *Oikos* **31**: 313-322.
- Olsen B, Jaenson TGT, Noppa L, Bunikis J, Bergström S (1993). A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* **362**: 340-342.
- Olsen B (2003). The role of birds in the ecology and epidemiology of Lyme borreliosis and ehrlichiosis. *Infect Dis* (2): 4-7.
- Olsen B, Duffy DC, Jaenson TGT, Gylfe A, Bonnedahl J, Bergström S (1995). Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 3270-3274.
- Ostfeld RS, Keesing F (2000). Biodiversity and disease risk: The case of lyme disease. *Conservation Biology* **14**(3): 722-728.
- Parola P, Raoult D (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* **32**: 897-928.
- Perez-Eid C (2007). Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Tec & Doc (Lavoisier): Paris, France.
- Perret JL, Guerin PM, Diehl PA, Vlimant M, Gern L (2003). Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol* **206**(11): 1809-1815.
- Postic D, Garnier M, Baranton G (2007). Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates--description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int J Med Microbiol* **297**(4): 263-271.
- Poulin R (2007). Evolutionary ecology of parasites, 2^{ème} edition. Princeton University Press: Princeton, New Jersey, E.-U., 342 p.
- Power AG, Flecker AS (2008). The Role of Vector Diversity on Disease Dynamics. Dans: Ostfeld RS, Keesing F and Evimer VT (éditeurs) Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems. Princeton University Press: Princeton, E.-U., pp 30-47.

- Price PW (1980). *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton University Press: Princeton, New Jersey, E.-U., 237 p.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**(2): 945-959.
- Prugnolle F, de Meeûs T (2002). Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity* **88**(3): 161-165.
- Qiu WG, Bosler EM, Campbell JR, Ugine GD, Wang IN, Luft BJ et al (1997). A population genetic study of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto from eastern Long Island, New York, suggested frequency-dependent selection, gene flow and host adaptation. *Hereditas* **127**: 203-216.
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao FK, Yang XFF, Fish D et al (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* **436**(7050): 573-577.
- Ras NM, Postic D, Foretz M, Baranton G (1997). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species 'made in the U.S.A.'? *Int J Syst Bacteriol* **47**(4): 1112-1117.
- Richter D, Schlee DB, Allgower R, Matuschka FR (2004). Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* **70**(11): 6414-6419.
- Roed KH, Hasle G, Midtjell V, Skretting G, Leinaas HP (2006). Identification and characterization of 17 microsatellite primers for the tick, *Ixodes ricinus*, using enriched genomic libraries. *Mol Ecol Notes* **6**(4): 1165-1167.
- Schmidt KA, Ostfeld RS (2001). Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* **82**(2): 609-619.
- Shao R, Barker SC, Mitani H, Aoki Y, Fukunaga M (2005). Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of Metazoa: a case study with Australasian *Ixodes* ticks. *Mol Biol Evol* **22**(3): 620-629.
- Shaw DJ, Dobson AP (1995). Patterns of macroparasite abundance and aggregation in wildlife populations: a quantitative review. *Parasitology* **111**: S111-S133.
- Smith VH, Holt RD (1996). Resource competition and within-host disease dynamics. *Trends Ecol Evol* **11**(9): 386-389.
- Sonenshine DE (1993). *Biology of ticks Volume 2*. Oxford University Press: Oxford, Royaume-Uni, 465p.
- Stanek G, Strle F, Gray J, Wormser GP (2002). History and Characteristics of Lyme Borreliosis. Dans: Gray J, Kahl O, Lane RS and Stanek G (éditeurs) *Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control*. CABI Publishing: Wallingford, Oxon, Royaume-Uni.
- Stireman JO, Nason JD, Heard SB, Seehawer JM (2006). Cascading host-associated genetic differentiation in parasitoids of phytophagous insects. *Proc Biol Sci B* **273**(1586): 523-530.

- Süss J (2003). Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* **21 Suppl 1**: S19-35.
- Talleklint L, Jaenson TG (1997). Infestation of mammals by *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in south-central Sweden. *Exp Appl Acarol* **21**(12): 755-771.
- Talleklint L, Jaenson TG (1998). Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in central and northern Sweden. *J Med Entomol* **35**(4): 521-526.
- Thompson JN (1994). The Coevolutionary Process. University of Chicago Press: Chicago, E.-U., 376pp.
- Troughton DR, Levin ML (2007). Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *J Med Entomol* **44**(5): 732-740.
- Via S (2001). Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends Ecol Evol* **16**(7): 381-390.
- Xu G, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA (2003). Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *J Parasitol* **89**(3): 452-457.
- Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS (2003). *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev* **16**(4): 622-636.